

FERNANDA WILTEMBURG

**ESPECIAÇÃO DE METAIS EM AMBIENTES AQUÁTICOS UTILIZANDO
DISPOSITIVOS DGT MODIFICADOS: APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE
TOXICIDADE FRENTE A PEIXES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Co-orientador:
Prof. Dr. Gilberto Abate

Curitiba

2012

Wiltemburg, Fernanda

Especiação de metais em ambientes aquáticos utilizando dispositivos DGT modificados: aplicação em ensaios de toxicidade frente a peixes / Fernanda Wiltemburg. – Curitiba, 2012.

79 f. : il.; tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química

Orientador: Marco Tadeu Grassi

Coorientador: Gilberto Abate

Bibliografia: p. 69-79

1. Elementos traços. 2. Metais - Toxicologia. I. Grassi, Marco Tadeu. II. Abate, Gilberto. III. Título.

CDD 546.22

TERMO DE APROVAÇÃO

ESPECIAÇÃO DE METAIS EM AMBIENTES AQUÁTICOS UTILIZANDO DISPOSITIVOS DGT MODIFICADOS: APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE TOXICIDADE FRENTE A PEIXES

por

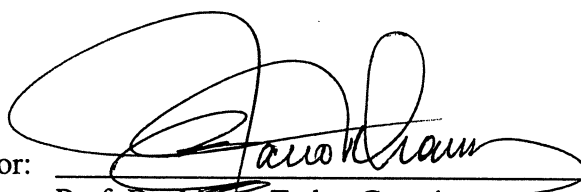
FERNANDA WILTEMBURG

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

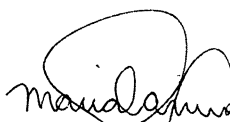
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

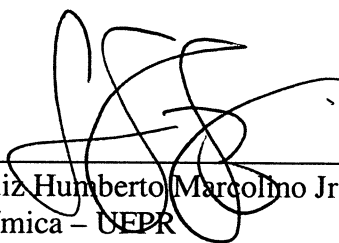
Orientador:



Prof. Dr. ~~Marco~~ Tadeu Grassi
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria (do Carmo) Hespanhol da Silva
Dep. de Química – UFV



Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 29 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus,

Aos meus pais Luciane e Marcos,

Aos orientadores deste trabalho Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e Prof. Dr. Gilberto Abate pela orientação e oportunidade,

Aos colegas do Grupo de Química Ambiental (GQA) em especial à Marcela F. Bortoletto, Vanessa Egea dos Anjos e Mônica S. de Campos pelos auxílios,

Aos parceiros nos ensaios ecotoxicológicos realizados neste trabalho – Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari (UFPR- Departamento de Genética), Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis (UFPR- Departamento de Farmacologia), Emanuelle C. Pesenti e Laércio D. S. Piancini (UFPR – Departamento de Genética), Inês Rabitto (UFPR- Departamento de Farmacologia),

Aos colegas do LABQAM,

Aos professores Luiz Humberto Marcolino Jr, Patricio G. Peralta-Zamora e Maria do Carmo Hespanhol da Silva pela participação nas bancas de qualificação e/ou defesa deste trabalho.

À minha família,

Aos meus amigos,

À CAPES/REUNI,

À UFPR,

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR.

RESUMO

Uma classe de poluentes muito estudada devido a seus efeitos são os metais traço, que podem ser encontrados em ambientes aquáticos na forma de íons livres hidratados e complexados a ligantes inorgânicos e orgânicos, na fração dissolvida, ou ainda associados ao material particulado em suspensão. A identificação destas formas, ou seja, a especiação química, fornece informações a respeito de sua reatividade, biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade. Para a análise de especiação química, o método utilizado neste trabalho baseia-se na difusão de espécies metálicas em filmes finos por gradiente de concentração, utilizando dispositivos conhecidos como DGT. Porém, os dispositivos utilizados foram modificados substituindo-se a camada sorvente original, resina *Chelex-100*, por um argilomineral, a montmorilonita (MT).

O argilomineral passou por um tratamento para sua purificação, ativação ácida e saturação com íons Na^+ , para potencialização de suas propriedades. O tratamento proposto mostrou-se eficiente em relação à remoção de íons metálicos contidos na MT *in natura*, com porcentagens de remoção superiores a 70%.

Para avaliação do desempenho do DGT modificado foi realizado um estudo de sorção de alguns íons metálicos, Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , na MT sob diversas condições de concentração, pH e força iônica. Foram obtidas porcentagens de sorção distintas devido à diferenças nas condições do meio e na natureza dos íons, causados por diferentes graus de interação entre os íons e o material sorvente. De modo geral, o metal com maiores porcentagens de sorção foi o cobre, obedecendo a seguinte ordem: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Co} \sim \text{Pb} > \text{Cd} \sim \text{Ba} \sim \text{Ni} \sim \text{Mn}$. Já o processo de dessorção, ou seja, extração do metal sorvido apresentou elevados valores de porcentagem de recuperação, superiores a 85%.

Antes de iniciar a aplicação do DGT-MT em bioensaios fez-se necessário um estudo prévio do efeito dos sólidos suspensos totais (SST) na concentração lábil dos metais, uma vez que o aumento do teor dos sólidos era visível nos aquários devido à adição de ração para alimentação dos peixes e excreção dos mesmos. Este estudo foi realizado para cádmio, cobre, chumbo e zinco e os resultados foram similares para os elementos estudados, com decaimento da

concentração de metal lábil com o aumento do teor de sólidos no meio. A presença de matéria orgânica e sólidos suspensos totais nos aquários diminui a biodisponibilidade dos metais uma vez que os metais sofrem complexação e adsorção; a fração livre, ou seja, biodisponível aos peixes foi bem inferior ao total adicionado nos aquários, encontrando-se abaixo de 10% da concentração total dos metais. A mesma tendência foi observada nos ensaios ecotoxicológicos utilizando DGT modificado; estes realizados a fim de verificar o efeito tóxico dos íons cobre e chumbo em peixes.

Assim, verificou-se a viabilidade do uso dos dispositivos DGT modificados com montmorilonita em ensaios ecotoxicológicos e a importância da especiação química uma vez que a fração lábil foi determinada, sendo esta a verdadeira responsável por possíveis efeitos tóxicos frente aos peixes.

ABSTRACT

A class of pollutants that has been extensively studied due to its effects towards the biota is the trace metals, which can be found in aquatic environments in the form of free hydrated ions and complexed with in inorganic and organic ligands in the dissolved fraction, or even associated with the particulate matter in suspension. The identification of these forms, i.e. the chemical speciation, provides information about its reactivity, mobility, bioavailability and toxicity. Chemical speciation analysis, the method used in this work, is based on the diffusion of metallic species in thin films due to a concentration gradient, using devices known as DGT (Diffusive Gradient in Thin Films). However, the devices were modified by substituting the original Chelex resin for a clay mineral Montmorillonite (MT).

The clay mineral went through an acidic activation and treatment aiming its purification, followed by its saturation with Na^+ to enhance its properties. The proposed treatment proved to be efficient in relation to the removal of metal ions contained in MT *in natura*, with removal percentages up to 70%.

To evaluate the performance of the modified DGT device the sorption of some metal ions, Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , onto MT was investigated under various conditions of concentration, pH and ionic strength. Distinct sorption percentages were obtained due to differences in the conditions of the medium as well as due to the nature of the ionic specie. In general, the sorption efficiency followed the order: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Co} \sim \text{Pb} > \text{Cd} \sim \text{Ba} \sim \text{Ni} \sim \text{Mn}$. Regarding the desorption process, i.e. extraction of metallic species sorbed on to MT high recovery values were obtained, exceeding 85%.

The MT-DGT devices were applied in ecotoxicological studies aiming to evaluate the toxicity of some metallic species towards fish. The modified devices were used in order to quantify and evaluate the behavior of labile concentration of species during the bioassays. But, first, a study was conducted to evaluate possible changes in labile concentrations, in the tanks, due to the presence of food residues. It was observed a decrease in concentration of labile species with time due to the adsorption of the metals by the suspended solids and also possibly due to their complexation by dissolved organic material.

Ecotoxicological tests were carried out for Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} using different type of fish. As a general trend, a decrease in the labile concentration was observed with time. After 24 h of contamination, an average of 10% of total initial concentration was determined in the labile form. In other words, the bioavailable fraction to fish was below the total added concentration

Thus, we collected many evidences of the viability of the use of modified MT-DGT devices in ecotoxicological tests.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Reagentes e materiais	27
3.2 Limpeza do material utilizado	27
3.3 Tratamento da Montmorilonita (MT)	28
3.4 Estudo de sorção e dessorção dos íons metálicos em montmorilonita	29
3.5 Montagem do dispositivo DGT-MT	31
3.6 Aplicação do dispositivo DGT-MT em estudos ecotoxicológicos	32
3.6.1 Efeito dos sólidos suspensos totais na labilidade das espécies metálicas (SST)	33
3.6.2 Estudos ecotoxicológicos de metais em aquários	33
3.7 Quantificação dos metais por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado – ICP-OES	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Tratamento da Montmorilonita (MT)	38
4.2 Estudo de sorção e dessorção dos íons metálicos em montmorilonita	41
4.3 Aplicação do dispositivo DGT-MT em estudos ecotoxicológicos	45
4.3.1 Efeito dos sólidos suspensos totais na labilidade das espécies metálicas (SST)	45
4.3.2 Estudos ecotoxicológicos de metais em aquários	49
4.3.3 Resultados preliminares dos efeitos causados pela contaminação com cobre em ensaios ecotoxicológicos	63
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do ciclo biogeoquímico de metais no meio ambiente	1
Figura 2	Representação esquemática das interações do metal na coluna d'água	2
Figura 3	Esquemas representativos do dispositivo de gradiente de concentração em filmes finos, DGT: a) DGT externamente, b) componentes do DGT	a)7 b) 8
Figura 4	Estrutura do hidrogel de poliacrilamida	9
Figura 5	Estrutura do hidrogel restritivo	10
Figura 6	a) copolímero de estireno e divinilbenzeno, b) íon sódio ligado a grupos quelantes da resina	10
Figura 7	Representação esquemática do gradiente de concentração estabelecido em um dispositivo DGT aplicado em solução aquosa	12
Figura 8	Esquema representativo de a) funcionamento de um sensor dinâmico genérico, b) absorção de íons por uma membrana celular	a) 13 b) 14
Figura 9	Diagrama esquemático: a) de uma folha tetraédrica, b) de uma folha octaédrica	17
Figura 10	Diagrama esquemático da estrutura cristalina das argilas do tipo Esmeclita (Montmorilonita)	18
Figura 11	Estrutura da Montmorilonita	19
Figura 12	Vias de assimilação dos metais no organismo dos peixes, transporte e acumulação	21
Figura 13	Esquema de um sistema de exposição do tipo fluxo-contínuo	23

Figura 14	Representação esquemática do cálculo para determinação dos valores de concentração de íons sorvidos na MT, porcentagem desta sorção e porcentagem de recuperação na dessorção.	31
Figura 15	Esquema da montagem do dispositivo: 1) membrana-suporte para MT; 2) fixação da MT com o auxílio da tampa acrílica do DGT; 3) massa de MT moldada; 4) membrana-suporte para MT após fixação; 5) conjunto membrana-MT-membrana ajustado ao tamanho na base acrílica; 6) hidrogel; 7) dispositivo montado, já com a membrana de proteção do hidrogel e tampa acrílica.	32
Figura 16	a) sistema modelo utilizado no estudo de efeitos de SST; b) membrana mista de ésteres de celulose utilizada na análise gravimétrica de sólidos suspensos totais.	33
Figura 17	Foto do aquário utilizado nos ensaios ecotoxicológicos	34
Figura 18	Concentrações dos elementos eluídos com HNO_3 de MT <i>in natura</i> e MT tratada	39
Figura 19	Porcentagens de remoção dos elementos no tratamento do argilomineral das etapas utilizando extrator	40
Figura 20	Variação da concentração de metal lábil com o aumento da concentração de SST	47
Figura 21	Aplicação do dispositivo em aquários	49
Figura 22	Variação da concentração de cobre lábil com o decorrer do Tempo	51
Figura 23	Variação da concentração de cobre lábil ao longo do bioensaio 2	53
Figura 24	Variação da concentração de cobre lábil ao longo do bioensaio 3	54

Figura 25	Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 4	56
Figura 26	Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 5	57
Figura 27	Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 6	59
Figura 28	Ensaio Cometa para o bioensaio 3	64
Figura 29	Resultados da avaliação de genotoxicidade do cobre utilizando o bioindicador <i>Astyanax fasciatus</i> em eritrócitos	65
Figura 30	Resultados da avaliação de genotoxicidade do cobre utilizando o bioindicador <i>Ctonopharyngodon idella</i> em Eritrócitos	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições experimentais do teste de sorção	30
Tabela 2	Condições experimentais para os ensaios Ecotoxicológicos	35
Tabela 3	Parâmetros e condições experimentais empregados nas determinações por ICP-OES	36
Tabela 4	Porcentagens de sorção dos elementos na MT em diversas condições	42
Tabela 5	Porcentagem de recuperação no processo de dessorção	45
Tabela 6	Teores de SST e concentrações de metais lábeis determinados	46
Tabela 7	Concentrações iniciais de cobre, tempo de exposição do DGT e concentrações de cobre lábil determinadas	50
Tabela 8	Teores de SST e concentrações De Cobre lábil determinadas no bioensaio 2	52
Tabela 9	Teores de SST e concentrações de cobre lábil determinadas no bioensaio 3	53
Tabela 10	Teores de SST e concentrações de chumbo lábil determinadas no bioensaio 4	55

Tabela 11	Teores de SST e concentrações de chumbo lábil determinadas no bioensaio 5	57
Tabela 12	Teores de SST e concentrações de chumbo lábil determinadas no bioensaio 6	58
Tabela 13	Resultados Obtidos nas determinações das concentrações totais de chumbo nos bioensaios 5 e 6	59

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ASV	Anodic Stripping Voltammetry – Voltametria de Redissolução Anódica
BLM	Modelo do Ligante Bótico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
D	Coeficiente de Difusão
DGT	Diffusive Gradients in Thin Films – Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração
DGT-MT	Dispositivo com a fase sorvente modificada, substituindo a resina comercial (Chelex-100) pelo argilomineral Montmorilonita (MT)
<i>Fe</i>	Coeficiente de eluição ou correção
GQA	Grupo de Química Ambiental
ICPOES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry – Espectrometria de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente
LQ	Limite de Quantificação
MT	Montmorilonita
MTD	Metal total dissolvido
MTR	Metal total recuperável
ML	Metal lábil
SST	Sólidos Suspensos Totais
Λ	Comprimento de onda

1- INTRODUÇÃO

As espécies metálicas são naturalmente incorporadas aos sistemas aquáticos por meio de processos geoquímicos. As fontes naturais em corpos aquáticos incluem o desgaste de rochas e de solos, devido ao intemperismo e ação direta dos corpos aquáticos sobre os mesmos, a deposição atmosférica, através das precipitações úmida e seca, atividades vulcânicas e tectônicas, fontes geotermiais. Mas em decorrência da elevação dos processos de urbanização e de industrialização, quantidades consideráveis dessas espécies têm sido introduzidas nos sistemas aquáticos, caracterizando as fontes antropogênicas. Segundo uma escala de tempo geológico recente, estima-se que a velocidade de introdução de espécies metálicas nos corpos d'água tem sido cerca de dez vezes superior à velocidade do ciclo biogeoquímico natural (Drever, 1988; Botelho, 1998).

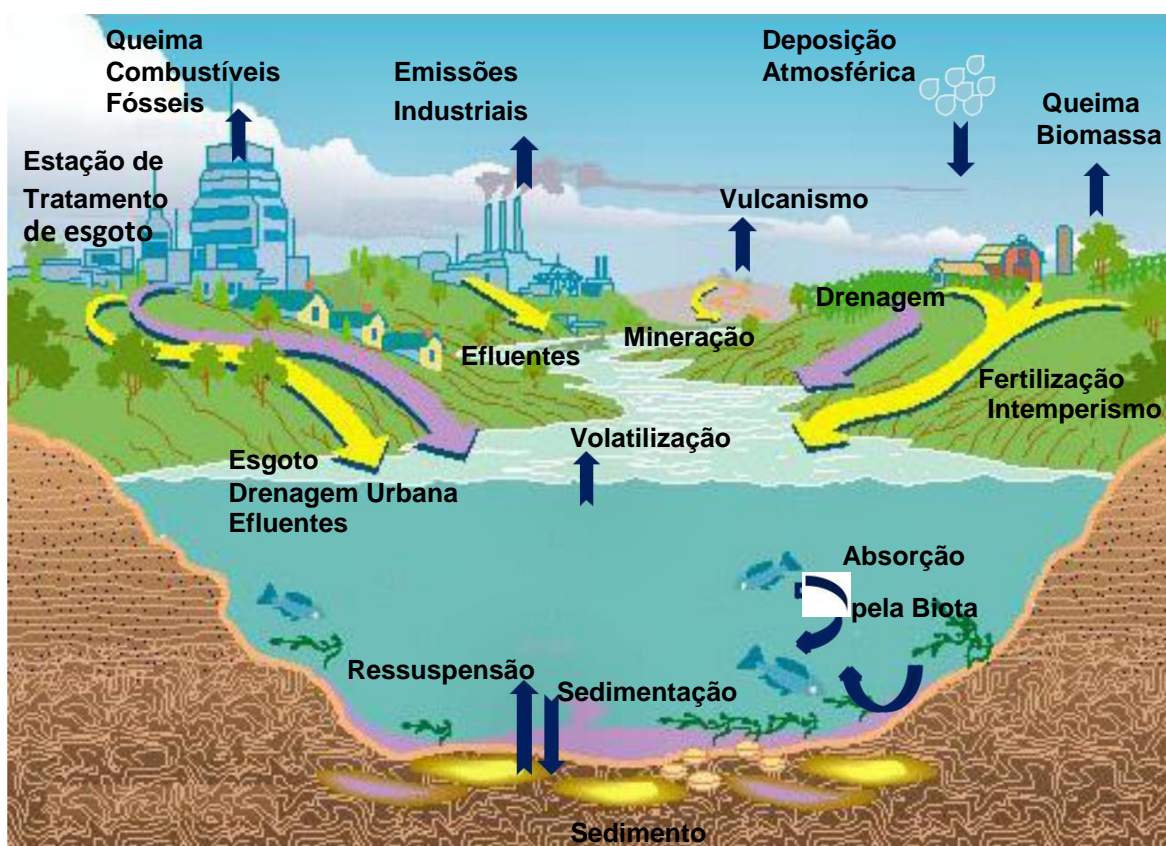


Figura 1: Esquema representativo do ciclo biogeoquímico de metais no meio ambiente. (adaptado de Garbarino *et al.*, 1995)

No que diz respeito aos sistemas aquáticos naturais, os metais são encontrados tipicamente em concentrações traço, na faixa entre ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nestes ambientes, os metais ocorrem sob diversas formas: incorporados à biota, retidos nos sedimentos, associados a partículas coloidais ou ainda na forma iônica ou complexada em solução. A distribuição de metais na coluna de água é influenciada por diversos fenômenos físico-químicos tais como: complexação, adsorção, dessorção, precipitação, redissolução, entre outros. A influência de cada processo sobre a partição das espécies depende do tipo de metal, das características do material em suspensão e da composição da coluna de água, pH, temperatura, força iônica, velocidade das correntezas, presença de ligantes disponíveis, atividade biológica e natureza da espécie metálica. A complexação dos metais com certos ligantes é útil para o decréscimo da toxicidade do metal, desde que os complexos sejam estáveis (Aguiar *et al.*, 2002; Mansilla-Rivera e Niriagu, 2003; Sodré *et al.*, 2004; Sodré *et al.*, 2005).

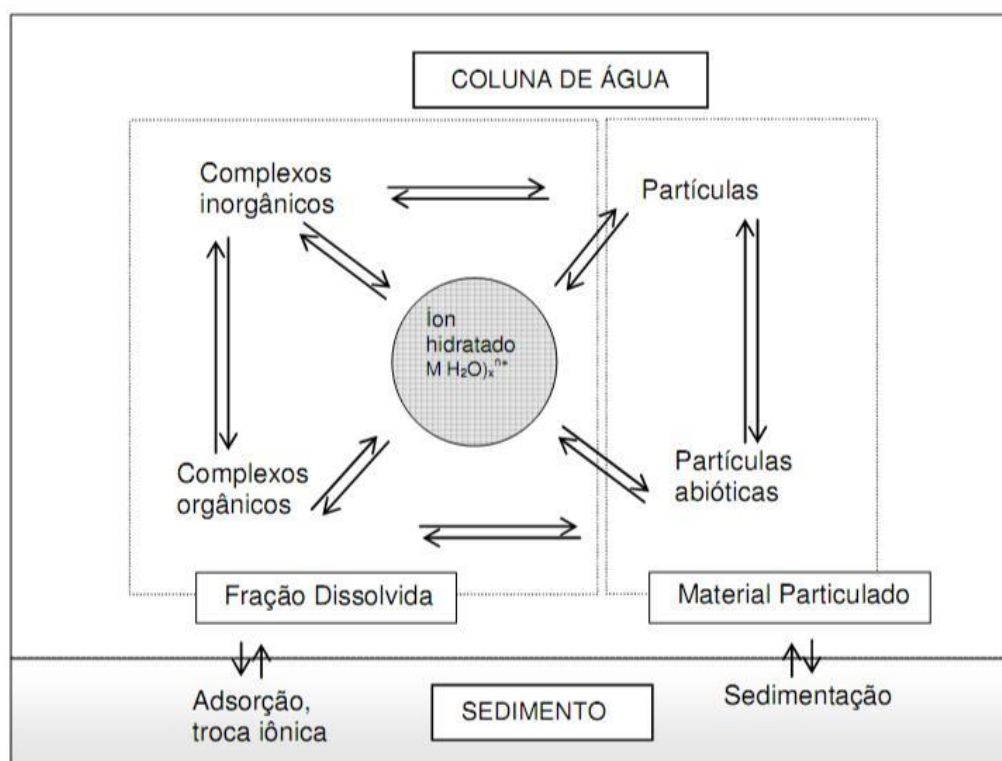


Figura 2: Representação esquemática das interações de espécies metálicas na coluna d'água (adaptado de Twiss *et al.*, 2001)

A figura 2 mostra as formas como uma espécie metálica pode ser encontrada em um sistema aquático bem como as possíveis rotas ocorridas no processo de partição.

Os metais traço podem ser encontrados na coluna d'água e no sedimento dos ambientes aquáticos. Na coluna d'água podem ser encontrados distribuídos entre a fração dissolvida ou particulada; esta distribuição é definida operacionalmente, através de uma filtração com membrana de 0,45 µm de porosidade. A fração que passa através desta membrana é considerada “dissolvida”, enquanto que a fração retida na membrana é chamada de “particulada” (Benoit *et al.*, 1994; Templeton *et al.*, 2000).

Na fração dissolvida incluem-se espécies metálicas livres, complexos orgânicos e inorgânicos ou ainda colóides. A concentração de íons livres hidratados geralmente representa uma pequena porção da concentração total de metal dissolvido. A fração de complexos inorgânicos (ligados a CO_3^{2-} , HCO_3^- , OH^- , Cl^- e SO_4^{2-}) é caracterizada pela labilidade e baixa estabilidade de seus complexos, o que possibilita a rápida dissociação do complexo, formando íons metálicos livres, sendo assim considerados complexos biodisponíveis (exceto os complexos de sulfetos e polisulfetos, pois apresentam constantes de estabilidade elevadas e resistem a oxidação e dissociação). Já a fração de complexos orgânicos, ligados a aminoácidos, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), matéria orgânica natural (MON), ligantes produzidos biologicamente (fitoquelantes e metalotioneínas), contribui para a redução da biodisponibilidade dos metais traço, uma vez que estes complexos não são rapidamente transportados pelas membranas celulares de organismos vivos (Tipping *et al.*, 1998; INAP, 2002).

As partículas sólidas são consideradas sorventes eficientes dos elementos, apresentando elevada importância na transferência de metais e na regulação das concentrações de espécies dissolvidas, podendo governar a partição e o comportamento dos metais. As formas particuladas dos elementos traço podem abranger associações dos elementos com colóides, microorganismos e sólidos suspensos inorgânicos (óxi-hidróxidos de ferro, alumínio, e manganês; carbonatos de cálcio e magnésio; sulfetos; argilominerais; sílica, etc.; essas partículas podem ser recobertas por matéria orgânica) e orgânicos (material biológico, produtos de excreção biológica ou materiais oriundos da decomposição total ou parcial de organismos aquáticos) (Jackson e Bistrick, 1995; Stumm e Morgan, 1996; Botelho, 1998; Burgos, 2005).

Assim, há a necessidade do conhecimento da forma com que as espécies podem assumir no ambiente para a compreensão dos ciclos biogeoquímicos das espécies metálicas bem como dos seus efeitos. Para a determinação da concentração e a identificação das diversas formas químicas de um dado elemento, que juntas constituem a concentração total do mesmo em uma matriz, é realizada a especiação química. Portanto, a especiação dos metais é um aspecto de grande relevância para a compreensão de sua reatividade, biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade em águas naturais (Sigg *et al.*, 2006). A diferenciação das formas em que o metal é encontrado no meio aquático é de alta relevância, uma vez que sua toxicidade está relacionada com a sua forma e não com sua concentração total, pois a absorção de metais pelos organismos é controlada pelas atividades dos íons metálicos livres, além do que as diversas espécies de um mesmo elemento comportam-se de maneiras distintas, o que confirma a necessidade de uma identificação de cada espécie. A especiação fornece informações baseadas em um maior entendimento do comportamento das espécies, para uma avaliação mais realista do impacto causado nos ambientes aquáticos (Barra *et al.*, 1999; Gervasio *et al.*, 2002; Svigg *et al.*, 2006; Scheffer *et al.*, 2007) .

A toxicidade dos metais traço está relacionada com a atividade dos seus íons na forma livre hidratada. A assimilação destes íons pelos organismos vivos pode ocorrer via fontes alimentares ou exposição ao meio ambiente. Uma vez absorvidos, os mesmos podem ser acumulados, biomagnificados e biotransformados (Sharma e Sohn, 2009).

Diante dos problemas ambientais causados por esses elementos, a necessidade de protocolos analíticos para especiação química torna-se um desafio para os químicos analíticos, fazendo com que novas técnicas sejam pesquisadas e utilizadas para este fim. Para as análises de especiação química, a técnica utilizada deve ser robusta, de sensibilidade adequada, de baixo custo e ainda possibilitar a compreensão da labilidade dos elementos, uma vez que a toxicidade destes está relacionada com a sua biodisponibilidade (Moreira e Moreira, 2004).

As abordagens experimentais e modelos mais clássicos empregados na análise de especiação de metais são fundamentados em princípios de equilíbrio

químico, pois consideram o sistema aquático um sistema não perturbado. Os procedimentos envolvidos possuem etapas como amostragem, estocagem, transporte, tratamento da amostra e determinação das espécies de interesse em laboratório e são conhecidos como procedimentos *ex situ* (Buffle e Horvai, 2000; Batley *et al.*, 2004).

Dentre os protocolos disponíveis podem-se citar os métodos espectrométricos e eletroanalíticos, além das modelagens computacionais, entre outros (Pesavento *et al.*, 2009).

Os métodos espectrométricos que vêm sendo utilizados para determinações de metais traço são os baseados em absorção atômica com atomização eletrotérmica (GFAAS); análise por ativação de nêutrons (NAA); emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICPOES) e espectrometria de massa com fonte de plasma acoplado indutivamente, (ICP - MS). A utilização destes métodos em análise de especiação necessita de um acoplamento de procedimentos de separação como, por exemplo, troca iônica, troca de ligantes, ultrafiltração, diálise, extração líquida, cromatografia de fase gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, etc. (Pesavento *et al.*, 2009).

Os métodos eletroanalíticos utilizados para especiação química são os potenciométricos e os voltamétricos. Os mais utilizados são os métodos voltamétricos, onde as informações sobre as espécies de interesse são obtidas pela medida da corrente em função do potencial aplicado; a corrente gerada no eletrodo é monitorada em função de uma varredura sistemática do potencial gerando um voltamograma onde a magnitude da corrente é proporcional à concentração do analito. Merece destaque a voltametria de redissolução anódica (ASV) com gota pendente de mercúrio, uma ferramenta analítica considerada clássica e com amplo emprego em análises de especiação química em sistemas aquáticos, apresenta baixos limites de detecção, baixo custo, boa sensibilidade e ainda avalia a interação entre o metal e os ligantes presentes na amostra (Batley *et al.*, 2004; Pretsch, 2007).

Os procedimentos *ex situ* são considerados dispendiosos e ainda podem possibilitar a ocorrência de adulterações da amostra devido a distúrbios na distribuição das espécies, seja por perdas dos analitos pela instabilidade das

espécies ou pela sorção dos mesmos na superfície de amostragem ou estocagem; por contaminação devido a manipulações; pela liberação de interferentes dos materiais; pela interrupção das atividades biológicas; alterações de pH, pressão e temperatura; etc. Apesar das limitações dos métodos *ex situ*, estes ainda representam a maioria dos procedimentos empregados na análise de especiação de metais (Buffle e Horvai, 2000; Sigg *et al.*, 2006).

Os modelos computacionais utilizados nos estudos de especiação de metais são baseados em princípios termodinâmicos. Foram desenvolvidos para responder como as características do meio afetam a distribuição e a toxicidade dos metais. Assim, pode-se prever a especiação de metais de acordo com as características químicas do meio e ainda descrever a partição do metal e a biodisponibilidade de metais para os organismos aquáticos, sugerindo o potencial tóxico de águas contaminadas. Os programas computacionais utilizados para análise de especiação e que se encontram disponíveis comercialmente e/ou gratuitamente são *MINEQL*, *MINTEQ*, *PHREEQ*, *GEOCHEM*, *CHEAQS*, *HYDRA*, *WHAM*, (NICA)-Donnan, etc. (Twiss *et al.*, 2001; Campbell, 1995; Scheffer, 2006). A heterogeneidade do meio e sua contínua modificação influenciam na dinâmica dos metais em água doce, afastando a possibilidade de concepção de modelos simplificados para o comportamento do metal. O modelo, para ser confiável, deve considerar a complexidade do meio, incluindo dados de pH, potencial redox e informações termodinâmicas sobre o sistema em estudo. Os modelos de especiação normalmente são restritos para águas diluídas com forças iônicas menores que a água do mar, $< 0,7 \text{ mol L}^{-1}$ (Warren e Haack, 2001; Langmuir, 1997). Além disso, a exatidão dos resultados obtidos dependerá da validade das constantes empregadas para alimentar o programa, observando as características do programa e seguindo diretrizes para evitar erros. O maior número de dados possíveis sobre o meio em estudo, obtidos criteriosamente, deve ser fornecido ao programa (Twiss *et al.*, 2000).

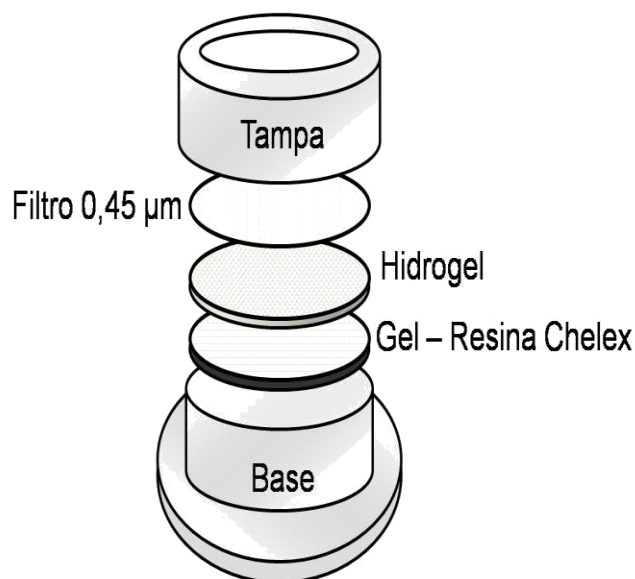
Os métodos *in situ* vêm sendo considerados os mais adequados para as análises de especiação, uma vez que levam em conta aspectos cinéticos e termodinâmicos do meio, estabelecendo bases analíticas mais sólidas que utilizem a aplicação de dispositivos analíticos no local, monitorando em tempo real os analitos. (Buffle e Horvai, 2000).

Uma das técnicas *in situ* que merece destaque é a difusão em filmes finos por gradiente de concentração, do inglês *diffusive gradients in thin films* (DGT), proposta por Zhang e Davison (Zhang e Davison, 1995).

Fisicamente, o dispositivo consiste em tampa e base de acrílico, uma membrana de nitrato de celulose com porosidade de $0,45\ \mu\text{m}$ para proteger a camada difusiva, camada de $0,4 - 2\ \text{mm}$ de poliacrilamida (hidrogel) e camada de resina de troca iônica, conforme esquematizado na Figura 3 (Zhang *et al.*, 1998; Kersanach *et al.*, 2009).



a)



b)

Figura 3: Esquemas representativos do dispositivo de gradiente de filmes finos, DGT: **a)** DGT externamente (<http://dgtresearch.com>), **b)** componentes do DGT (adaptado de Twiss e Moffet, 2002).

Os metais difundem-se através da camada de gel de difusão, gerando gradientes de concentração e são acumulados na camada de material sólido adsorvente, a resina *Chelex-100*, onde são pré-concentrados. Após um tempo (t) de exposição, os metais são eluídos da resina com solução ácida e determinados pela técnica analítica disponível (Sangi *et al.*, 2002; Twiss e Moffet, 2002).

As membranas utilizadas no DGT apresentam um tamanho de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ e podem ser de nitrato de celulose, de acetato de celulose ou ainda mista de ésteres. Suas funções são proteger a camada de difusão e impedir a passagem de partículas sólidas para o interior do dispositivo (Davison e Zhang, 1994).

O hidrogel, camada difusiva, é um material polimérico poroso, insolúvel e hidrofílico que controla a difusão dos metais no sistema. Estruturalmente é constituído por uma ou mais redes de polímeros tridimensionais, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas. Sua hidrofobicidade é controlada pela natureza dos grupos

funcionais neste material ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$) e sua solubilidade é controlada pelo seu grau de reticulação (Oviedo *et al.*, 2008; Aouada, 2009). Os hidrogéis que têm sido amplamente empregados nos sensores DGT são os de poliacrilamida, formados com acrilamida e um reticulador derivado da agarose (Zhang e Davison, 1999). Sua estrutura está ilustrada na Figura 4.

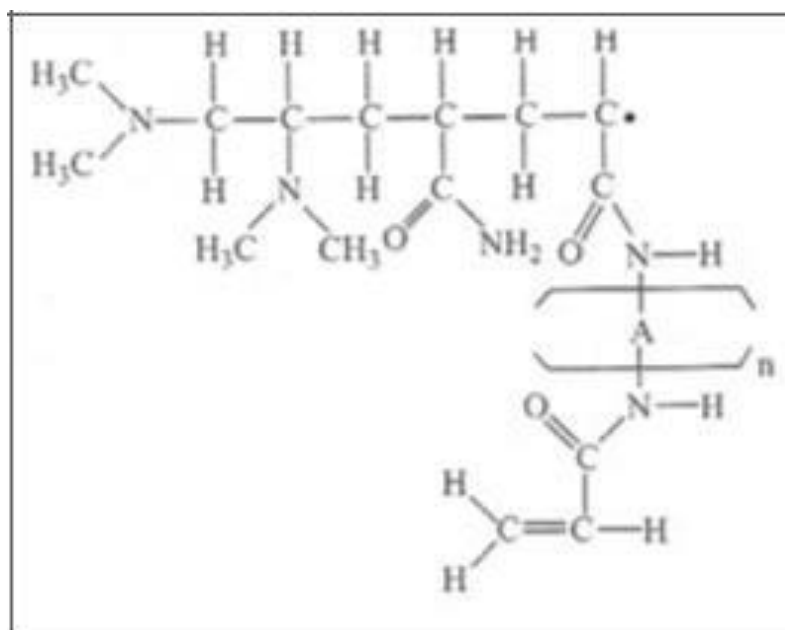


Figura 4: estrutura do hidrogel de poliacrilamida (adaptado de Zhang *et al.*, 2000).

As propriedades do hidrogel podem ser modificadas alterando as proporções dos reagentes. A difusão dos elementos através desta fase difusiva é influenciada pela espessura desta camada e pelo seu grau de reticulação, ou seja, quantidade de agente reticulante que controla o tamanho de poro. No hidrogel utilizado no DGT disponível comercialmente há aproximadamente 10% de agente reticulador (Zhang e Davison, 2000; Zhang e Davison, 1999). Hidrogel com poros menores, ou seja, mais reticulados podem restringir mais o processo de difusão. Os hidrogéis restritivos podem determinar apenas a fração inorgânica lábil dos metais (Zhang e Davison, 2001).

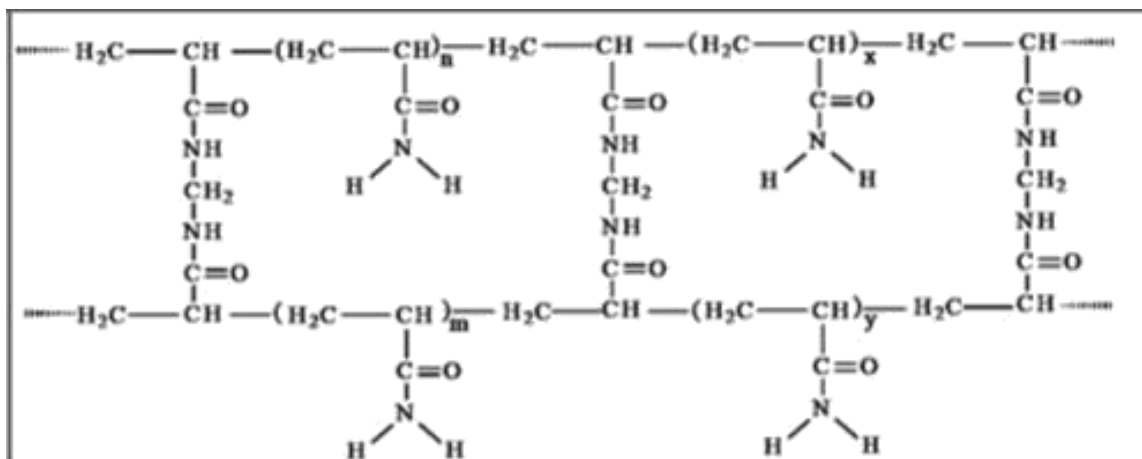


Figura 5: estrutura do hidrogel restritivo (adaptado de Aouada, 2005).

A camada sorvente, onde os metais difundidos serão acumulados e pré-concentrados, é constituída por um hidrogel impregnado com Chelex-100, um copolímero de estireno divinilbenzeno quimicamente incorporado a ácidos iminoacéticos, grupos complexantes (Andrade, 2005). A Chelex-100 possui alta afinidade com íons metálicos (formação de complexos e/ou troca iônica), formando quelantes bidentados com cátions polivalentes, apresenta alta capacidade de acumulação simultânea de metais e fácil processo de extração dos metais acumulados (Riler e Taylor, 1968).



Figura 6: **A)** copolímero de estireno e divinilbenzeno; **B)** Íon sódio ligado a grupos quelantes da resina (adaptado de Bendo, 2002; Andrade, 2005.)

O uso deste dispositivo depende diretamente da difusão e da adsorção ocorridas em suas camadas para seu bom funcionamento. A difusão no DGT segue a Primeira Lei de Difusão de Fick, onde se calcula a concentração de metais difundidos e adsorvidos. A quantidade de metal adsorvido na resina depende de fatores como coeficiente de difusão, labilidade e penetrabilidade dos complexos. Apenas os íons metálicos livres e os complexos metálicos que se dissociam são adsorvidos na resina (Davison *et al.*, 2000; Gimpel *et al.*, 2003). A equação a seguir é utilizada para calcular a massa de metal retida na camada sorvente:

$$M = \frac{C_e (V_{gel} + V_{ácido})}{f_e} \quad (1)$$

onde C_e : concentração determinada do íon metálico eluído da resina (g cm^{-3}), V_{gel} : volume do hidrogel-Chelex ($0,16 \text{ cm}^3$), $V_{ácido}$: volume do ácido usado na eluição ($1,0 \text{ cm}^3$) e f_e : fator de eluição do íon metálico (0,8).

Zhang e Davison (1995) verificaram que, em média, cerca de 80% de Fe, Zn, Cd, Cu, Ni e Mg acumulados na resina podem ser recuperados. Assim, os autores indicam que um fator de eluição de 0,8 seja adotado nas medidas com o sistema DGT (o fator de eluição refere-se à eficiência do processo de eluição e recuperação dos íons retidos).

A equação 2 é utilizada para o cálculo da concentração da fração lábil do metal, uma vez já obtido o valor de massa retida na camada sorvente na equação 1.

$$C_{Lábil} = \frac{M \Delta_g}{D A t} \quad (2)$$

onde g : espessura da camada de difusão (espessuras do gel difusivo e da membrana de filtração), A : área superficial do hidrogel que fica exposta à solução, t : tempo de aplicação do dispositivo (s) e D : coeficiente de difusão do metal no hidrogel ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$). Os valores de f_e , Δg , A e D utilizados foram aqueles fornecidos pelo fabricante dos dispositivos DGT (Gimpel *et al.*, 2003).

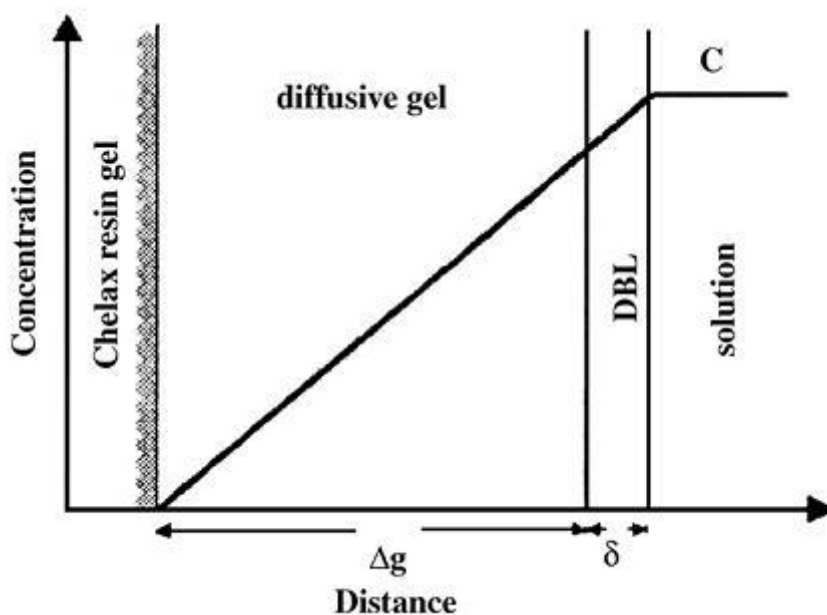
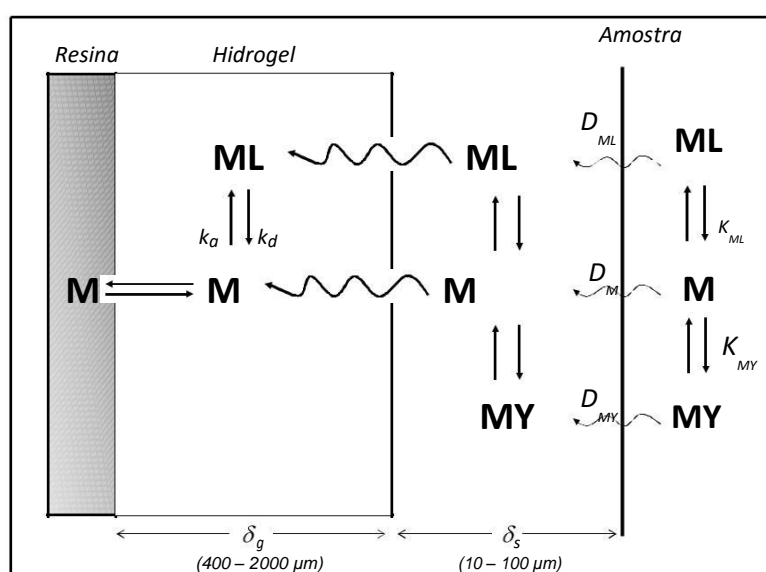


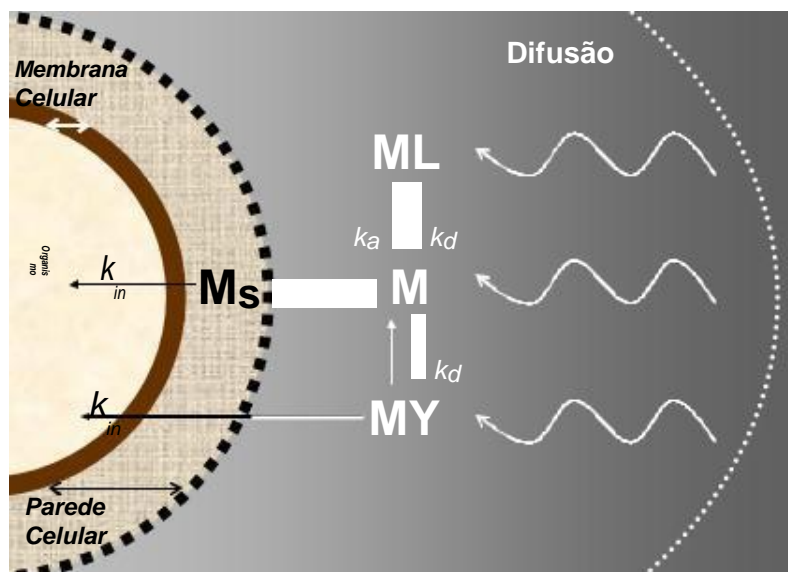
Figura 7: Representação esquemática do gradiente de concentração estabelecido em um dispositivo DGT aplicado em solução aquosa (Zhang *et al.*, 1995).

Na Figura 7 está ilustrado o processo de difusão ocorrido no dispositivo, oriundo do gradiente de concentração estabelecido entre a solução e a fase sorvente. Observa-se a dependência da espessura da camada de difusão no processo e ainda a necessidade de se levar em conta a espessura da membrana externa e de uma possível camada de biofilme formada na janela do DGT (δ).

A difusão ocorrida no DGT similar à difusão que ocorre no transporte de metais em sistemas aquáticos e na sua absorção pelos organismos. Essa similaridade é mostrada em esquemas simplificados expostos na Figura 8.



a) DGT.



b) Membrana celular.

Onde, MY: complexo lipofílico transportado intacto para o meio celular, ML: complexos metálicos que dependem das constantes de dissociação para seu transporte via parede celular, M: íon metálico, MS: metal sorvido na parede celular, k_a, k_d : constantes de associação e dissociação, k_{in} : constante de interiorização.

Figura 8: Esquema representativo de **a)** funcionamento de um sensor dinâmico genérico, **b)** absorção de íons metálicos por uma membrana celular (Adaptado de Köster e van Leeuwen, 2004 e van Leeuwen *et al.*, 2005).

A absorção dos metais por um organismo envolve as seguintes etapas: o transporte do meio externo, a sorção na parede externa da célula e na interiorização dos metais através da membrana celular. Vale salientar que apenas uma fração do metal é bioativa na superfície celular, ou seja, apenas o íon livre e os complexos cineticamente reversíveis podem ser transferidos via difusão para o interior celular (Köster e van Leeuwen, 2004). O transporte depende da manutenção da transferência de massa que, geralmente, ocorre por difusão devido ao gradiente de concentração formado entre a membrana e o meio externo. Já a transferência dos elementos para o interior da célula depende da reatividade, estabilidade, e afinidade biológica das espécies metálicas na parede celular (Köster e van Leeuwen, 2004).

No DGT, o hidrogel controla o transporte de massa das espécies metálicas no sensor. As espécies que se difundirão livremente através do hidrogel são as que possuem tamanhos moleculares suficientemente menores que o tamanho de poro do hidrogel. As espécies livres (M) e as espécies capazes de se dissociar de complexos metálicos (ML) no hidrogel são acumuladas na fase sorvente coletora através de complexação ou troca iônica.

Baseia-se em processos dinâmicos de difusão, sendo um método preciso e uma ferramenta importante no conhecimento da concentração exata de metais em análises de especiação, quando utilizado em conjunto com um método de determinação adequado. Outra característica importante é o fato da inexistência de interferentes relacionados à coleta, armazenamento e tratamento da amostra, uma vez que somente a eluição e a determinação ocorrem em laboratório (Torre *et al.*, 2000; Alexa *et al.*, 2009).

O dispositivo DGT é considerado simples e de fácil aplicação *in situ*, além de robusto, sensível e não necessita de calibração, sendo necessário apenas a aplicação da equação da primeira lei de Fick para a obtenção da concentração da fração lábil de metais. A obtenção dos resultados é rápida e integrada com o tempo de medida, resultando assim em valores médios para o período de aplicação do sensor (Davison *et al.*, 2000). Outra grande vantagem deste dispositivo é a capacidade multielementar, o que facilita o processo de especiação de mais de uma espécie metálica ao mesmo tempo (Matsumiya *et al.*, 2006). Apresenta alta capacidade de acumulação simultânea de metais, que são eluídos facilmente através da utilização de solução ácida (Riley e Taylor, 1968). A gama de matrizes que podem ser utilizadas nas análises é variada, águas naturais, solos e sedimentos o que caracteriza mais uma vantagem para esta técnica (Sally *et al.*, 2006). Pode-se ainda controlar o tamanho dos poros da camada de hidrogel, para que ocorra uma ampliação ou limitação do tipo de espécies a serem difundidas e adsorvidas no sensor (Kovarikova *et al.*, 2007).

Como toda técnica, a difusão em filmes finos por gradiente de concentração apresenta algumas limitações como, por exemplo, a existência de problemas de precisão e exatidão para análises em locais com alto teor de matéria orgânica e baixa força iônica (podendo ocorrer co-difusão em locais com força iônica inferior a $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e a necessidade de se conhecer exatamente

os coeficientes de difusão das espécies no hidrogel. Além disso, o DGT não pode ser reutilizado e ainda o custo da resina Chelex-100 é elevado (Inap, 2002; Garmo *et al.*, 2008;).

Quanto à resina Chelex-100, outras desvantagens do seu uso são a baixa seletividade, pois pode ocorrer acumulação parcial de metais alcalinos terrosos quando em concentrações elevadas nas várias matrizes; eficiência limitada frente a oxianions (As, Mo, Se, V e Sb) e alta dependência do pH, uma vez que em baixos valores de pH há protonação da resina, comprometendo a eficiência de acumulação da resina; a faixa de pH indicada para se obter uma melhor eficiência encontra-se entre 5 e 9 (Zhang e Davison, 1995; Gimpel *et al.*, 2001; Inap, 2002).

Uma das alternativas para amenizar estes pontos negativos da técnica é a utilização de fases minerais, material sorvente natural, como trocador iônico, com ampla ocorrência natural e baixo custo como, por exemplo, óxidos e argilominerais. Estes materiais possuem alta capacidade de troca catiônica (CTC), estrutura laminar, baixa granulometria e ainda podem ser reutilizados, tornando-se assim altamente eficientes na adsorção de metais (Aguiar *et al.*, 2002). Outras características que favorecem a aplicação das fases minerais como concentradores analíticos são: baixo custo, grande disponibilidade, facilidade de purificação e boa inércia química (Rezende *et al.*, 2011).

Estudos comprovam a capacidade de adsorção de contaminantes pelo solo, relacionando este fenômeno com a presença de óxidos e hidróxidos de argilas. Essas fases minerais apresentam elevada área superficial ($700\text{-}800\text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e alta CTC ($80\text{-}200\text{ mmol}/100\text{g}$) e são estudadas, principalmente, para tratamento de efluentes com íons metálicos (Toni *et al.*, 2006; Frois *et al.*, 2011).

Os principais óxidos presentes no solo são os de Fe^{3+} e Al^{3+} e podem ser vistos como lâminas octaédricas empilhadas, sem a lâmina tetraédrica de silício. Possuem cargas variáveis em sua superfície que são afetadas pelo pH do solo de origem, devido às ligações com H^+ (Hawkes, 1996).

Os argilominerais são minerais conhecidos como filossilicatos e são materiais naturais, terrosos, hidrofílicos e de granulação fina. Suas partículas apresentam diâmetro inferior a $2\text{ }\mu\text{m}$ e são silicatos hidratados de alumínio, ferro

ou manganês que possuem estruturas cristalinas em camadas (Coelho *et al.*, 2007; Teixeira-Neto e Teixeira-Neto, 2009).

Podem ser classificados de acordo com sua estrutura cristalina: sendo do tipo 1:1 ou 2:1, contendo uma folha tetraédrica e uma octaédrica e contendo duas folhas tetraédricas e uma octaédrica interna, respectivamente. As folhas tetraédricas são formadas por tetraedros de Si–O com cantos compartilhados; cada tetraedro compartilha três de seus cantos com três tetraedros vizinhos, resultando em uma fórmula estrutural de $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n$ para a folha tetraédrica. Já as folhas octaédricas são compostas por cátions Al^{3+} ligados a ânions O^{2-} e OH^- , resultando em uma fórmula química efetiva de $\text{AlO}(\text{OH})_2$.

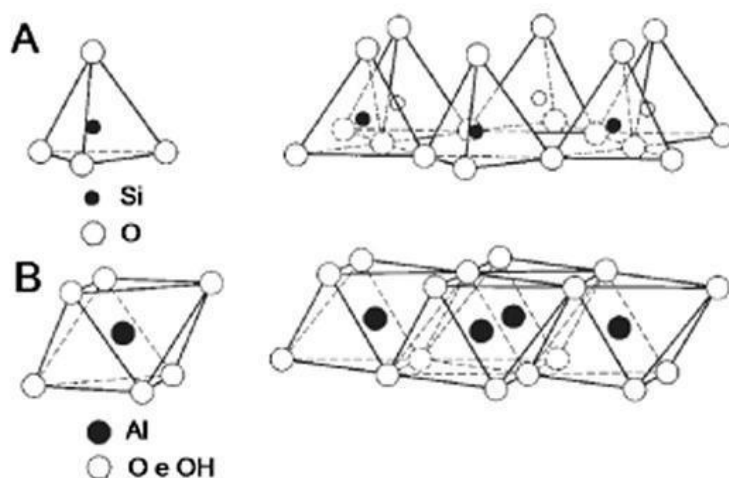


Figura 9: Diagrama esquemático: **a)** de uma folha tetraédrica e **b)** de uma folha octaédrica (Teixeira-Neto, 2009).

As camadas tetraédrica e octaédrica ligam-se através do compartilhamento de um oxigênio de um tetraedro de Si–O com um octaedro $\text{AlO}(\text{OH})_2$.

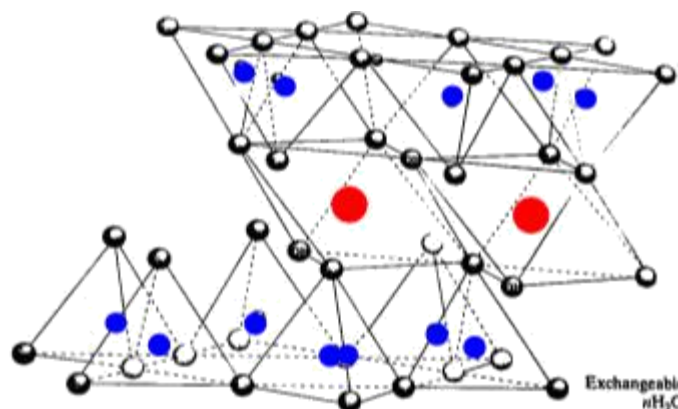


Figura 10: Diagrama esquemático da estrutura cristalina das argilas do tipo Esmeclita (Montmorilonita) (Hawkes,1996).

Para a utilização como material constituinte de um sensor DGT o argilomineral mais indicado é o do tipo 2:1, pois possui grande capacidade de troca catiônica (CTC) devido ao *déficit* de cátions coordenados na camada octaédrica, o que confere elevada carga nas camadas; a substituição ocorre através de troca de um íon por outro, podendo induzir a formação de cargas negativas que são balanceadas através de cátions interlamelares hidratados, alcalinos ou alcalinos-terrosos. No tipo 1:1 o argilomineral mais comum e abundante é a caulinita e no tipo 2:1 é a montmorilonita (MT) (Cavalcanti *et al.*, 2009; Teixeira-Neto e Teixeira-Neto, 2009).

A montmorilonita, de fórmula molecular $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$ pertence ao grupo dos filossilicatos 2:1. O empilhamento das placas é regido por forças polares relativamente fracas e por forças de van der Waals, existindo entre as placas lacunas denominadas galerias nas quais residem cátions trocáveis como Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , fixos eletrostaticamente e com a função de compensar cargas negativas geradas por substituições isomórficas que ocorrem no reticulado. A elevada capacidade de sorção deste argilomineral se deve a sua estrutura, sendo que 80% dos cátions trocáveis estão presentes nas suas galerias e 20 % nas superfícies laterais, como está ilustrado na figura a seguir (Paiva *et al.*, 2008)

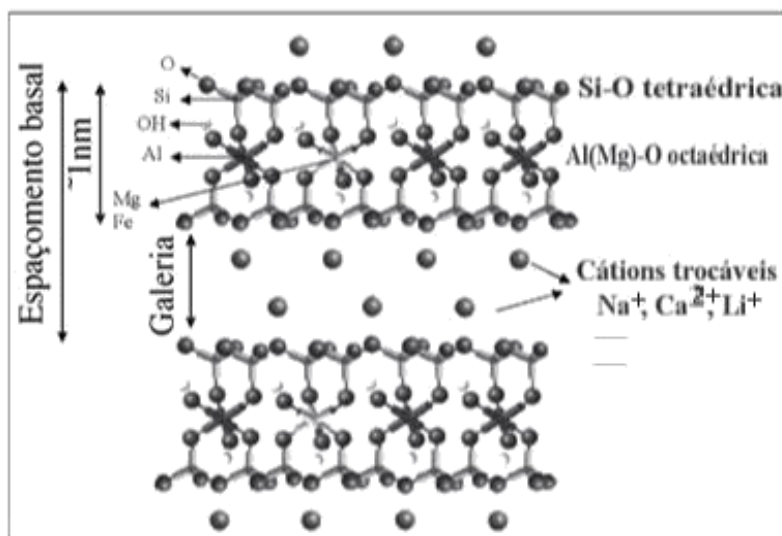


Figura 11. Estrutura da montmorilonita. (Paiva *et al.*, 2008)

Os argilominerais têm sido utilizados na remoção de espécies metálicas de efluentes industriais na remoção de íons em água potável ou água de caldeiras e até mesmo na purificação de substâncias orgânicas e inorgânicas. Na natureza, adsorvem metais ou poluentes orgânicos no solo, diminuindo suas frações solúveis e, conseqüentemente, sua lixiviação (Aguiar *et al.*, 2002).

Neste contexto, o Grupo de Química Ambiental (GQA) desenvolve há anos pesquisas na área de especiação química de metais. Sodré *et al.* (2004) propuseram um método alternativo para a digestão de amostras de águas naturais (digestão fotoquímica), em estudos envolvendo tanto a partição como a especiação do cobre. O procedimento proposto mostrou-se bastante eficiente para digestão de amostras *in natura*, em um curto tempo e sem perdas significativas da espécie de interesse. Outra pesquisa realizada pelo grupo teve como objetivo realizar um estudo comparativo da labilidade de certas espécies metálicas (Cd^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2}) empregando a voltametria de redissolução anódica (ASV), o DGT e um modelo computacional de especiação (CHEAQS). Os três métodos apresentaram resultados concordantes entre si, ampliando a gama de métodos que podem ser utilizados na especiação química, cada um com suas particularidades, vantagens e desvantagens (dos Anjos *et al.*, 2010). Tonietto e Grassi (*no prelo*) fizeram análise de especiação do cobre e chumbo em amostras de águas naturais do Rio Iraí com voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, implantando uma metodologia utilizando KNO_3 como eletrólito de

suporte e HNO_3 para preservação da amostra. Scheffer *et al.* (2007) estudaram os principais fatores responsáveis pelo controle da especiação do cobre em águas de rios da região metropolitana de Curitiba, considerando a influência de fatores geoquímicos e dos sulfetos solúveis; podendo diferenciar o nível de impacto dos rios, pelas atividades antrópicas, através da determinação de parâmetros aquáticos. Observaram ainda que a transferência do cobre da fração dissolvida para a particulada foi maior nos rios mais impactados e ainda a influência dos O.D. na complexação do cobre com os sulfetos.

Anjos (2010) desenvolveu e avaliou, em sua tese de doutoramento, dispositivos empregando materiais de baixo custo como fase sorvente, argilominerais, fornecendo informações a respeito da especiação de uma ampla gama de metais. Os resultados obtidos evidenciaram o excelente desempenho destes dispositivos modificados com montmorilonita em diversas condições experimentais, sem diferenças significativas em relação ao DGT comercial. Vale salientar que neste trabalho ainda foi testado o argilomineral Vermiculita, mas deu-se prosseguimento ao trabalho com a Montmorilonita uma vez que esta se mostrou mais eficiente no processo de sorção com os metais. A montagem do dispositivo foi otimizada, através de testes de massa de MT utilizada, modo de fixação, tipo de membrana, agente extrator utilizado na eluição da fase sorvente, tempo de contato do DGT nas amostras, etc.; além de um estudo da eficiência da MT em sorver os metais e a recuperação dos mesmos no processo de eluição. Outra pesquisa avaliou o potencial da montmorilonita na sorção e dessorção de cromo (III), visando a especiação entre as formas (III) e (VI). O argilomineral apresentou alta interação com o Cr (III) e não interagiu com o Cr (VI), sendo viável sua aplicação para especiação entre estas duas formas (Frois *et al.*, 2011). Este mesmo argilomineral foi testado para Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} empregando dispositivos DGT-MT em amostras de águas sintéticas, com excelentes resultados de sorção e dessorção e os resultados para frações lábeis mostraram-se comparáveis aos resultados com DGT comercial (Anjos, 2011)

Quanto à aplicabilidade dos dispositivos DGT, a utilização de técnicas envolvendo especiação química em testes ecotoxicológicos (bioensaios) é de suma importância, uma vez que a fração biodisponível dos metais é determinada;

substituindo os testes que eram realizados (e ainda são) com base na concentração total dos metais.

Para entender a importância destes testes faz-se necessário compreender os efeitos danosos causados pelos metais nos organismos dos peixes. A toxicidade está relacionada não somente com a especiação química dos metais, mas também com a fisiologia dos peixes, a maneira como estes se comportam na presença dos íons metálicos. Os metais são assimilados pelo organismo através das guelras, sendo esta considerada o sítio de ação tóxica (Almeida, 2007)

A absorção pode ocorrer através de dois processos biológicos: bioacumulação e biomagnificação. A bioacumulação ocorre quando os metais, dissolvidos ou em suspensão, são absorvidos do meio por difusão ou por ingestão, através das brânquias e do trato digestivo; quando estes metais absorvidos são acumulados nos tecidos dos peixes o processo passa a se chamar de bioconcentração. Já a biomagnificação ocorre quando organismos superiores da cadeia trófica se alimentam de organismos inferiores já contaminados com os íons metálicos (Costa, 2007).

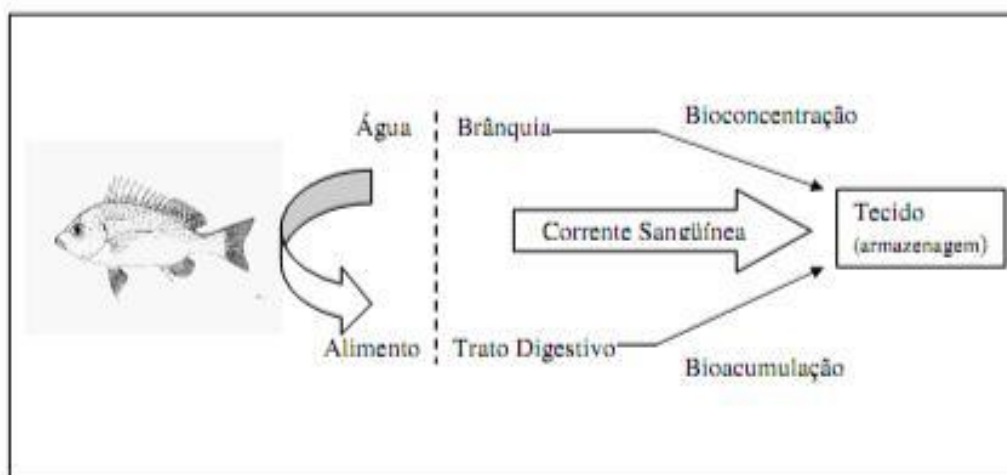


Figura 12: Vias de assimilação dos metais no organismo dos peixes, transporte e acumulação (Costa,2007)

Uma vez assimilados, os metais podem exercer funções vitais ou causar efeitos tóxicos; isso dependerá da forma com que foi absorvido e/ou da sua concentração. Assim, são classificados como essenciais e não essenciais. Os essenciais (Cu, Fe, Mn e Zn) são os que possuem função biológica conhecida e são constituintes obrigatórios do metabolismo dos organismos; mas mesmo com função biológica conhecida, quando em grandes concentrações, podem apresentar toxicidade aos organismos. Os elementos não essenciais (Al, Hg, Pb, Cd, Ag, Cr (VI), Ni e Sn) não possuem função biológica e assim são tóxicos aos organismos (Costa,2007).

Para estudar esta interação dos metais com os efeitos tóxicos causados nos peixes que os assimilaram, são realizados ensaios ecotoxicológicos. Estes ensaios são experimentos laboratoriais que permitem a compreensão da ação tóxica de contaminantes e são utilizados para obtenção de dados e padronização de metodologias. Permite avaliar quais efeitos um dado xenobiótico, em determinada concentração, pode causar em uma dada espécie de organismo vivo (Ramsdorf, 2007). Os testes ecotoxicológicos são realizados com espécies sensíveis ao metal alvo e ecologicamente representativas do meio. Os organismos são expostos ao metal por um determinado período de tempo e após este período verificam-se os efeitos, bem como: mortalidade, comportamento, reprodução, crescimento, dentre outros.

Os métodos de exposição de peixes aos agentes tóxicos, em laboratórios, são geralmente por imersão (quando os poluentes se encontram dissolvidos na água), através de injeção intraperitoneal com o xenobiótico que está tendo sua toxicidade testada a ou por via trófica, quando as cobaias recebem alimentos previamente expostos ao metal alvo pelo pesquisador.

A toxicidade de um agente químico também está relacionada ao tempo de exposição e a concentração da substância testada. Dessa forma, dependendo das características da substância-teste, como solubilidade, volatilidade, e bioacumulação, podem-se utilizar diferentes sistemas de exposição em ensaios de toxicidade laboratoriais, como os descritos a seguir (Zagatto, 2006)

- *Sistema estático*: Os organismos são expostos à mesma solução durante o período do experimento, ou seja, a solução não é renovada. Esse sistema é

recomendado para testes de curta duração (em torno de 48 horas), com substâncias não voláteis ou pouco degradáveis.

- *Sistema semi-estático*: Nesse sistema há troca parcial da solução-teste através de sua remoção, do preparo e da recolocação de novas soluções no recipiente - teste. Esse sistema é usado quando a substância não é muito estável, ou quando se necessita de um teste mais prolongado.
- *Sistema em fluxo contínuo*: As soluções-teste, nesse sistema, fluem continuamente através dos recipientes onde os organismos-teste se encontram. O fluxo deve ser capaz de manter constante a concentração da substância-teste.

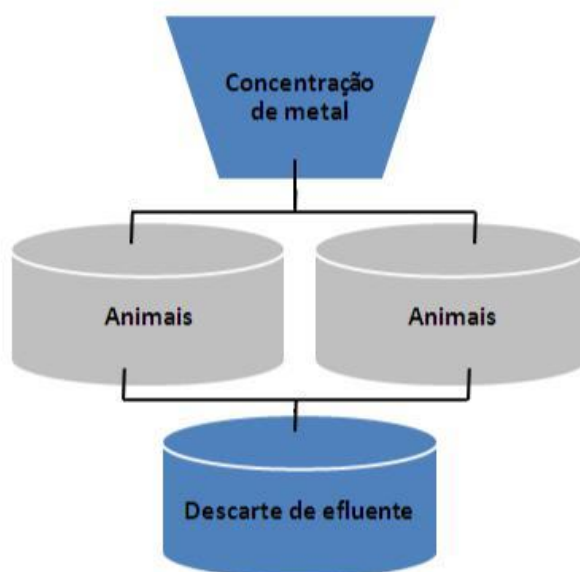


Figura 13: esquema de um sistema de exposição do tipo fluxo -contínuo (adaptado de Dal Pont, 2009)

Normalmente os resultados dos testes ecotoxicológicos são expressos na forma de uma curva dose-resposta, por exemplo, CL50 - concentração letal para 50% dos organismos testados (Martins e Bianchini, 2008; Castro *et al.*, 2009). As respostas biológicas a contaminações podem ser evidenciadas em diversos níveis de organização, desde ecossistemas até compartimento subcelulares ou reações químicas intracelulares. Assim, são utilizados nos bioensaios marcadores

bioquímicos, fisiológicos e histológicos capazes de indicar diferentes respostas à presença de estressores distintos. Em nível de DNA, os principais testes são os de avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, ensaio cometa e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (Huggett, 1992; Walker, 1997; Bombail, 2001).

Buscando minimizar algumas deficiências dos ensaios ecotoxicológicos em aquários foram desenvolvidos modelos matemáticos, incorporando aspectos geoquímicos e fisiológicos com o intuito de avaliar potenciais impactos biológicos dos metais no ambiente aquático (Martins e Bianchini, 2008). Um exemplo é o Modelo do Ligante Biótico (BLM), fundamentalmente baseado no equilíbrio químico e que foi incorporado aos protocolos voltados para determinação da toxicidade do cobre pela Agência Estadunidense de Proteção Ambiental (EPA). Este modelo prediz a toxicidade do metal por meio da determinação da quantidade de metal livre capaz de se ligar às brânquias dos organismos aquáticos, levando em conta as características físico-químicas da água e os processos de complexação dos metais com ligantes químicos, determinando matematicamente a relação entre a exposição e o efeito através da simulação de um bioensaio. Com o BLM não se verifica diretamente quais as espécies são biodisponíveis, mas sim as consequências da exposição do organismo às mesmas (Dal Pont *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009).

O BLM possui algumas desvantagens, como: aplicação a poucos metais (Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+}) e poucas espécies de organismos aquáticos, dentro de uma mesma espécie a toxicidade varia de acordo com algumas características do indivíduo, como massa corporal, sexo, idade, etc., restrição do uso em ambientes marinhos e estuarinos devido à base de dados que o modelo utiliza, geração de resultados confiáveis somente em uma pequena faixa de força iônica (não confiável para força iônica maior que $0,3 \text{ mol L}^{-1}$), a necessidade do conhecimento de uma ampla gama de parâmetros físico-químicos do meio (alcalinidade, dureza, pH, carbono orgânico dissolvido, força iônica, etc), não leva em consideração a assimilação de metais via dieta e a determinação somente de toxicidade aguda dos metais (Martins e Bianchini, 2008).

Sendo assim, torna-se bastante atrativa a possibilidade de não apenas prever, mas corretamente determinar a fração lábil (biodisponível) de espécies metálicas durante a realização dos testes de toxicidade, para uma possível relação da concentração lábil com os efeitos causados pelas espécies metálicas nos peixes. O DGT ainda possibilita esta determinação sem a necessidade de se conhecer uma ampla gama de parâmetros físico-químicos do meio, além de todas as vantagens de uma técnica *in situ* de não adulteração da amostra. A partir disto, os bioensaios realizados com aplicação dos dispositivos podem apresentar resultados mais realistas sobre o contaminante do que os bioensaios atualmente descritos na literatura.

2- OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é o estudo da especiação *in situ* de íons metálicos em sistemas aquáticos, utilizando DGT com Montmorilonita (MT) como fase sorvente em substituição à resina Chelex-100. Para alcançar este objetivo, as seguintes etapas foram propostas:

1. Preparação dos dispositivos DGT-MT, com hidrogel difusivo de poliacrilamida como fase difusiva e montmorilonita (MT) como fase sorvente;
2. Avaliação do desempenho dos dispositivos modificados aplicados sob diferentes condições;
3. Aplicação dos dispositivos em ensaios ecotoxicológicos utilizando diferentes espécies de peixes como organismos-teste. Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da UFPR e o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR, a fim de verificar o efeito tóxico dos metais em peixes a partir da determinação da sua fração lábil.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e materiais

Como a concentração dos íons metálicos encontra -se em níveis traço, alguns cuidados foram tomados para minimizar a presença de interferentes que pudessem vir a alterar os resultados, como por exemplo, a utilização de água ultrapura (Milli-Q; Millipore) na preparação das soluções utilizadas nos experimentos e diluições de soluções padrão metálicas 1000 mg L^{-1} (Tritisol Merck, Accustandard). Outras iniciativas foram tomadas a fim de garantir a minimização de contaminantes nas análises, tais como: limpeza das vidrarias e materiais utilizados na confecção dos dispositivos e tratamento do argilomineral montmorilonita (MT). O tratamento do argilomineral consistiu, além da purificação, em uma ativação ácida e na saturação com Na^+ .

As soluções metálicas utilizadas foram preparadas por diluição de soluções padrão monoelementares de 1000 mg L^{-1} das marcas Tritisol, Merck e AccuStandard.

O material para montagem dos dispositivos DGT foi adquirido da empresa DGT Research Ltd., Inglaterra (hidrogel e suportes).

O argilomineral montmorilonita-K10 (MT) foi adquirida da empresa Aldrich.

3.2 – Limpeza do material utilizado

A limpeza das vidrarias e das bases do DGT foi realizada de acordo com as seguintes etapas: (i) Lavagem com detergente comum; (ii) Duplo enxágue com água destilada; (iii) Banho com detergente Extran[®] neutro (Merck) por dois dias; (iv) Enxágue com água destilada; (v) Banho com ácido nítrico 10% por três dias; (vi) Enxágue com água ultrapura, Milli Q.

A purificação das membranas utilizadas no DGT foi realizada da seguinte maneira: membranas mistas de ésteres de celulose (Whatman) foram

purificadas através de filtrações a vácuo com 10 mL de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e posteriormente com 70 mL de água Milli-Q.

3.3 – Tratamento da Montmorilonita (MT)

Antes da utilização da MT na confecção dos dispositivos DGT, o argilomineral passou por um tratamento para sua purificação, ativação ácida e saturação com Na^+ . As etapas do tratamento seguem a seguinte ordem:

- (i) Pesagem de 0,5g de MT *in natura* em cada tubo de centrífuga;
- (ii) Argilomineral mantido em contato e sob agitação com 5 mL de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) por duas horas. Centrifugação;
- (iii) Lavagem com 5 mL de água Milli-Q. Centrifugação;
- (iv) Repetição dos procedimentos acima descritos;
- (v) Fases sólidas foram mantidos em contato e sob agitação com 5 mL de NaNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) por uma hora. Centrifugação;
- (vi) Dupla repetição do processo de saturação com Na^+ ;
- (vii) Tripla lavagem com água Milli-Q;
- (viii) Secagem dos sólidos em estufa a 80°C ;
- (ix) Peneiramento dos sólidos com peneiras plásticas com malha de Teflon de 330 e 390 mesh para obtenção de partículas com granulometria entre 38 e $50 \mu\text{m}$.

Para confirmação da eficácia do tratamento da Montmorilonita, amostras de argilomineral *in natura* e argilomineral tratado passaram por um processo de eluição com HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) por 24 h, centrifugação e determinação por ICP-OES. A comparação entre os resultados mostrou a porcentagem de remoção de íons metálicos presentes no material sorvente natural.

Ampliou-se o estudo do processo de purificação da MT através de um monitoramento das etapas de lavagem ácida realizadas, retirando-se alíquotas dos sobrenadantes de ambas as etapas para determinação da eficiência de remoção de cada lavagem ácida do tratamento.

Os teores de íons metálicos encontrados na MT tratada foram utilizados nos cálculos envolvidos na especiação química utilizando dispositivos DGT, sendo descontados do valor determinado para não haver superestimação de resultados (brancos analíticos).

3.4 – Estudo de sorção e dessorção dos íons metálicos em montmorilonita

Para avaliar a sorção dos íons metálicos no argilomineral MT realizou-se estudos em diferentes condições de pH, concentração e força iônica à temperatura ambiente por 24 h. Soluções metálicas multielementares (Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+}) foram preparadas a partir de padrões de metais individuais (1000 mg L^{-1}) e tiveram o pH ajustado com soluções de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e HNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e a força iônica com soluções de NaNO_3 , nas condições listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições experimentais do teste de sorção.

Ensaio	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH	Força iônica (mol L^{-1})	Ensaio	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH	Força iônica (mol L^{-1})
1	10	6	0,01	11	50	7	0,01
2	10	7	0,01	12	50	8	0,01
3	10	8	0,01	13	50	6	0,05
4	10	6	0,05	14	50	7	0,05
5	10	7	0,05	15	50	8	0,05
6	10	8	0,05	16	50	6	0,1
7	10	6	0,1	17	50	7	0,1
8	10	7	0,1	18	50	8	0,1
9	10	8	0,1	19	30	5	0,001
10	50	6	0,01	20	30	5	1,0

Em cada ensaio, a MT (0,1 g) ficou em contato com a respectiva solução metálica por 24 h. Após este período, onde ocorreu a sorção, foi realizada uma centrifugação para separação da MT, e metais sorvidos, do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração dos íons não sorvidos pelo argilomineral, via ICP-OES.

O estudo de dessorção foi realizado logo após a retirada dos sobrenadantes do processo de sorção adicionando-se, como extrator, HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), permanecendo em contato com as fases sólidas por 24 h. Após centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados para determinar as concentrações dos íons dessorvidos, via ICP-OES.

Os valores de concentração de íons sorvidos na MT tal como a percentagem desta sorção e percentagem de recuperação na dessorção são calculados de acordo com o esquema a seguir ilustrado.

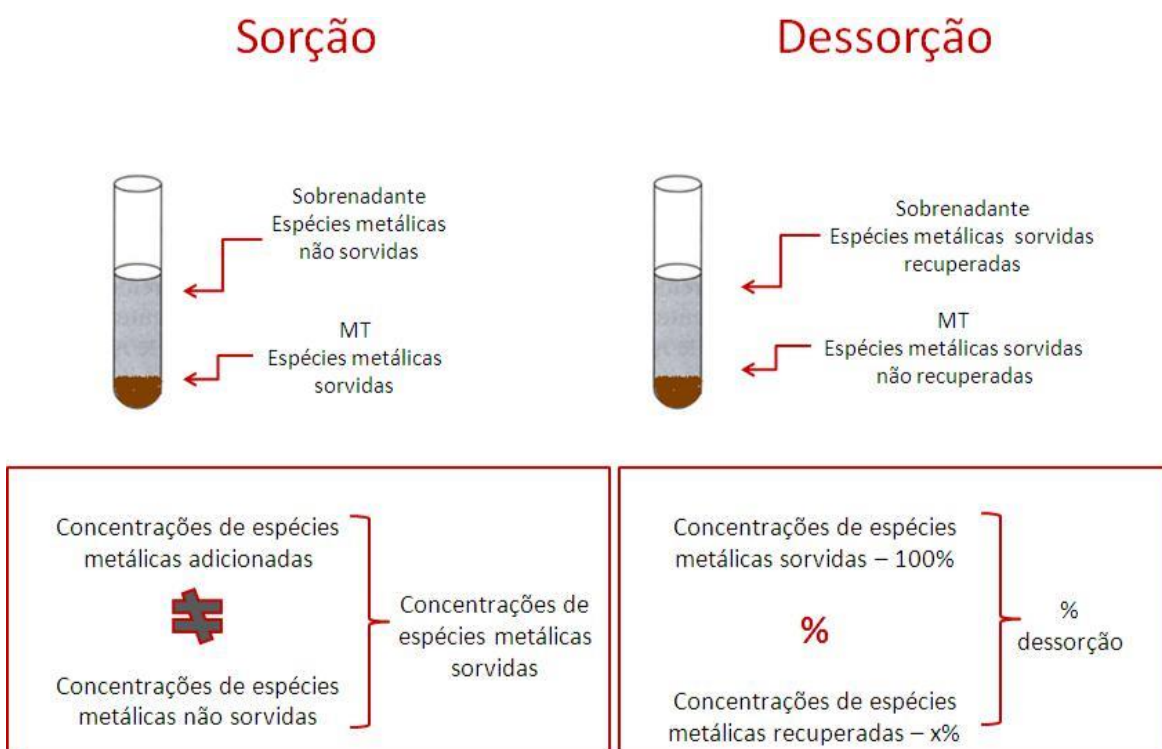


Figura 14: representação esquemática do cálculo para determinação dos valores de concentração de íons sorvidos na MT, percentagem desta sorção e percentagem de recuperação na dessorção.

3.5 – Montagem do dispositivo DGT-MT

A montagem do dispositivo modificado consistiu basicamente na fixação do argilomineral nas membranas de suporte, adaptação das dimensões do sistema membrana -MT-membrana ao tamanho da base do DGT e por fim na montagem em si, que seguiu a ordem: base acrílica, membrana, MT, membrana, hidrogel, membrana e tampa acrílica.

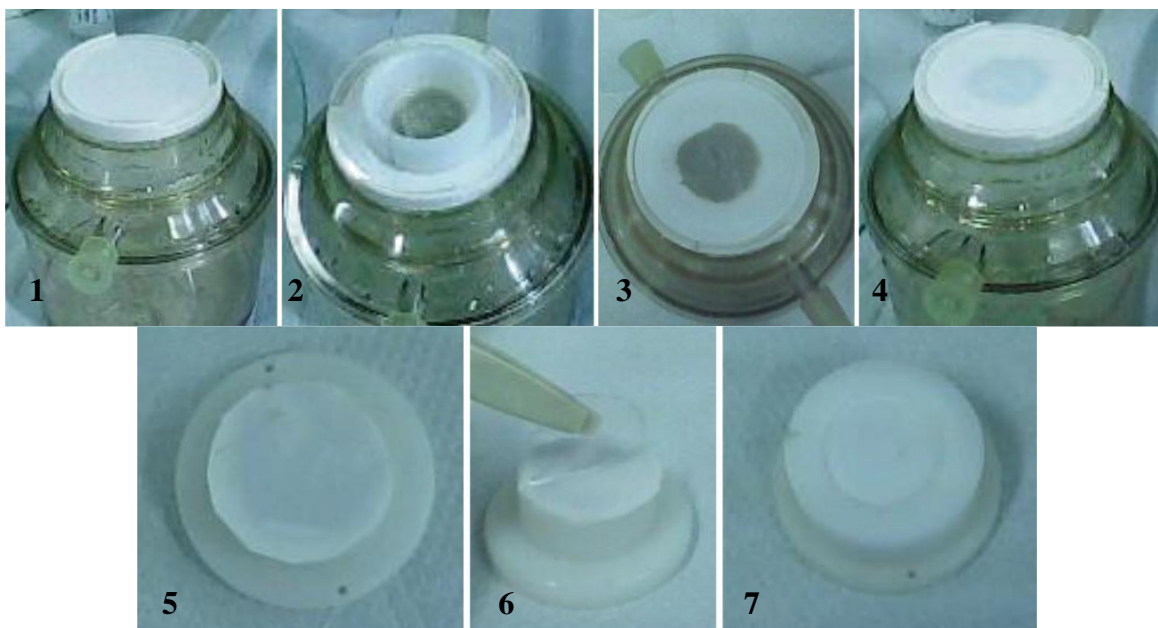


Figura 15: esquema da montagem do dispositivo: 1) membrana-suporte para MT; 2) fixação da MT com o auxílio da tampa acrílica do DGT; 3) massa de MT moldada; 4) membrana-suporte para MT após fixação; 5) conjunto membrana - MT-membrana ajustado ao tamanho na base acrílica; 6) hidrogel; 7) dispositivo montado, já com a membrana de proteção do hidrogel e tampa acrílica.

Após a confecção do DGT, o mesmo foi mantido em solução de NaNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) até sua aplicação, para evitar o ressecamento do sistema e deslocamento de MT para outras camadas do sistema .

3.6 – Aplicação do dispositivo DGT-MT em estudos ecotoxicológicos

Uma etapa preliminar aos ensaios de toxicidade fez-se necessária, uma vez que a biodisponibilidade do metal está diretamente relacionada com a composição do meio. Devido à adição diária de ração nos aquários para alimentação dos peixes e também a excreção realizada pelos mesmos, percebe-se um aumento da presença de sólidos suspensos e também sólidos depositados no fundo do aquário. Assim, realizou-se um estudo da concentração de metais lábeis frente ao aumento da concentração de sólidos suspensos totais (SST).

3.6.1 – Efeito dos Sólidos Suspensos Totais na labilidade das espécies metálicas (SST)

O estudo foi realizado em um sistema modelo com aplicação do dispositivo DGT em solução multielementar (Cd^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2}) de concentração conhecida, $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, com adições diárias de ração para peixes, nas devidas proporções, também de modo semi-estático. Como o objetivo era apenas avaliar o efeito do aumento da concentração de SST na concentração de metal lábil optou-se pela ausência de peixes no sistema modelo.

Cada dispositivo foi exposto por 24 h, perfazendo um total de sete dispositivos utilizados. Diariamente, no momento da troca do DGT, uma alíquota da solução era retirada para determinação da concentração de SST via análise gravimétrica.

Assim, foi possível analisar a relação entre a concentração de metal lábil dos metais e a concentração de SST no meio.



Figura 16: a) sistema modelo utilizado no estudo de efeitos de SST; b) membrana mista de ésteres de celulose utilizada na análise gravimétrica de sólidos suspensos totais.

3.6.2 – Estudos ecotoxicológicos de metais em aquários

Em parceria com o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental e com o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Genética e Farmacologia da Universidade Federal do Paraná

foram realizados estudos dos efeitos da contaminação com metais em peixes, aplicando dispositivos DGT anteriormente montados.

O processo iniciou-se com um período de 30 dias de aclimatização, ou seja, período de adaptação onde os peixes ficaram dispostos no mesmo aquário que viria a ser contaminado e sob as mesmas condições de temperatura, alimentação, etc. O sistema de exposição utilizado foi o sistema semi-estático, com contaminação no primeiro dia do bioensaio de maneira integral e troca parcial diária da solução-teste através da retirada e reposição de 1/3 do volume de água do aquário e re-contaminação proporcional a este 1/3 com o respectivo metal a fim de garantir que a concentração adicionada não fosse bruscamente alterada ao longo dos dias devido à adsorção, complexação e/ou absorção dos íons. Outras condições dos ensaios ainda merecem destaque, bem como a alimentação diária dos peixes, a aeração dos aquários e a não utilização de filtros nos mesmos. As concentrações escolhidas para serem utilizadas foram baseadas na Resolução Conama 357 de 2005 (ABNT, 2006).



Figura 17: Foto do aquário utilizado nos ensaios ecotoxicológicos.

As condições experimentais dos bioensaios estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 2: condições experimentais para os ensaios ecotoxicológicos.

	Bioensaio 1	Bioensaios 2 e 3	Bioensaio 4	Bioensaios 5 e 6
Metal	Cobre	Cobre	Chumbo	Chumbo
Espécie	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax fasciatus</i> <i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Rhamdia quelen</i>
Nome popular	Jundiá	Lambari-do-rabo-vermelho Carpa-capim	Jundiá	Jundiá
Concentração de metal adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,0 9,0 18,0	13,0	10,0	10,0 100,0
Período de contaminação (dias)	4	7	7	15
Tempo de exposição do DGT (h)	24	24	24	24
Volume do aquário (L)	108	108	100	100
Número de indivíduos	20	15	10	10
Adição de ração	Uma vez ao dia	Uma vez ao dia	Uma vez ao dia	Uma vez ao dia
pH	6,6 – 7,1	6,9 -7,7 7,0 – 7,6	6,8 – 7,2	6,3 – 6,8
Temperatura (°C)	20 - 23	16 - 19 14 - 19	16 - 18	23 – 25,3
Período de realização	Novembro/2010	Maio/2011 Agosto/2011	Maio/2011	Novembro/2011
Estudos biológicos	Alterações morfológicas nucleares e lesões no DNA	Mecanismos de reparo (30 dias sem contaminação após ensaio)	Nível de estresse enzimas endócrinas	Nível de estresse enzimas endócrinas

Os bioensaios 2 e 3 ocorreram em períodos diferentes para cada espécie, mas seguindo as mesmas condições, assim como os bioensaios 5 e 6.

A cada 24 horas havia troca da solução-teste, retirada e reposição de dispositivo bem como sacrifício de alguns indivíduos para as análises biológicas. Alíquotas também eram armazenadas para a determinação dos teores de SST. Após a retirada dos DGT, os dispositivos foram abertos e os conjuntos membrana-MT-membrana foram eluídos com 3,0 mL de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) por 24 horas. As concentrações foram determinadas via ICP-OES.

Para as determinações das concentrações de Mn e Cd nos bioensaios 5 e 6, as amostras foram digeridas fotoquimicamente em reator ativado por microondas, como proposto por Sodré *et al.* (2004).

3.7 – Quantificação dos metais por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado – ICP-OES

As concentrações dos metais foram determinadas via ICP-OES da marca Thermo Scientific, modelo iCAP 6500. As condições experimentais estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3: parâmetros e condições experimentais empregadas nas determinações por ICP-OES.

Parâmetros	
Potência de Radiofrequência (W)	1150
Vazão do argônio na nebulização (L min^{-1})	0,2
Vazão do argônio auxiliar (L min^{-1})	0,5
Vazão do argônio principal (L min^{-1})	12
Visão do plasma	Axial
Calibração externa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0 – 1000,0
Padrão Interno	Y ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$)

Utilizou-se a construção de curvas analíticas, com padrão interno nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,010; 0,050; 0,10; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹. Adicionou-se solução de padrão interno de 0,100 mg L⁻¹, ítrio (Y), a todos os controles, padrões e amostras. A utilização da adição de ítrio se mostrou necessária para compensar desvios referentes à presença de elementos facilmente ionizáveis (Na, K e Ca) (Trevisan e Nóbrega, 2007; de Campos, 2009).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Tratamento da Montmorilonita (MT)

A fim de remover possíveis impurezas, sejam elas adsorvidas na superfície ou localizadas entre as lamelas do argilomineral, e de obter uma melhor homogeneidade, maiores capacidade de troca iônica, porosidade e área superficial realizou-se um tratamento da montmorilonita com HNO_3 e posterior saturação com íons Na^+ . A potencialização das propriedades dos argilominerais oriunda do tratamento favorece a sorção dos elementos no mesmo (Abate e Masini, 2005; Teixeira-Neto e Teixeira-Neto, 2009; Rezende *et al.*, 2010).

O tratamento do argilomineral é uma etapa de grande importância, uma vez que pode comprometer os resultados obtidos a partir da utilização da MT como fase sorvente. Um tratamento eficaz diminui a presença de impurezas e/ou interferentes, e proporciona a obtenção de um material com baixo nível de contaminação e consequente garantia de um branco (controle) adequado à análise de traços (Teixeira-Neto e Teixeira-Neto, 2009).

Como a montmorilonita é um material natural é comum a presença de íons metálicos, oriundos dos solos. Assim, o tratamento também visa a retirada da maior quantidade possível destes metais da MT para posterior uso como fase sorvente de íons metálicos. Para confirmação da eficácia do tratamento da Montmorilonita, amostras de argilomineral *in natura* e tratado passaram por um processo de eluição com HNO_3 para a comparação das concentrações determinadas por ICP-OES dos íons metálicos eluídos do material *in natura* e do material tratado.

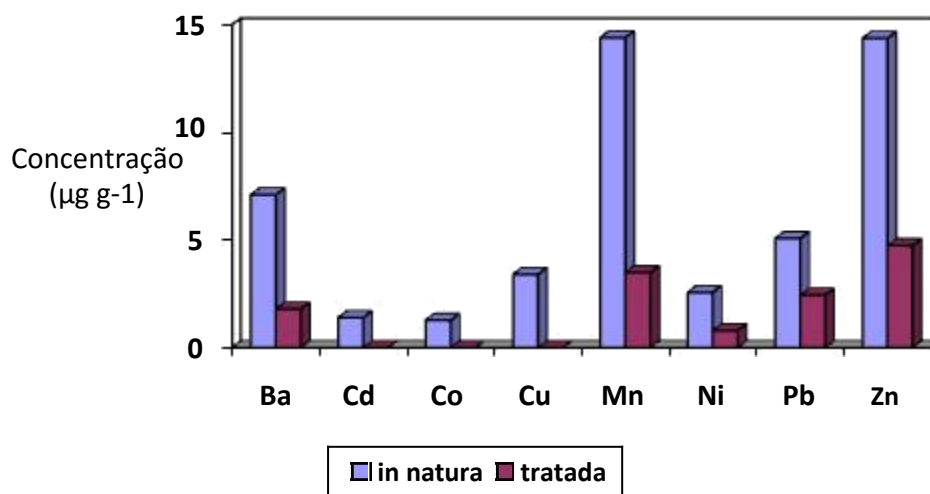


Figura 18. Concentrações de elementos eluídos com HNO₃ de MT *in natura* e MT tratada.

Pode-se observar na figura 18 que as concentrações de metais encontradas na montmorilonita após o tratamento são inferiores as encontradas na MT *in natura*, com diferenças significativas. Para o zinco, por exemplo, a concentração passou de 14 µg g⁻¹ na MT *in natura* para 4,7 µg g⁻¹ na MT tratada. Assim, fica evidente a necessidade do tratamento deste argilomineral para seu uso no DGT, pois as altas concentrações iniciais das espécies metálicas na MT comprometeriam os resultados da aplicação do dispositivo em locais onde os metais são encontrados em concentrações a nível traço.

Para uma melhor abrangência do tratamento foi realizado estudo de remoção dos elementos em cada lavagem ácida retirando alíquotas dos sobrenadantes após centrifugação. As porcentagens de remoção alcançadas em cada etapa estão representadas na Figura 19.

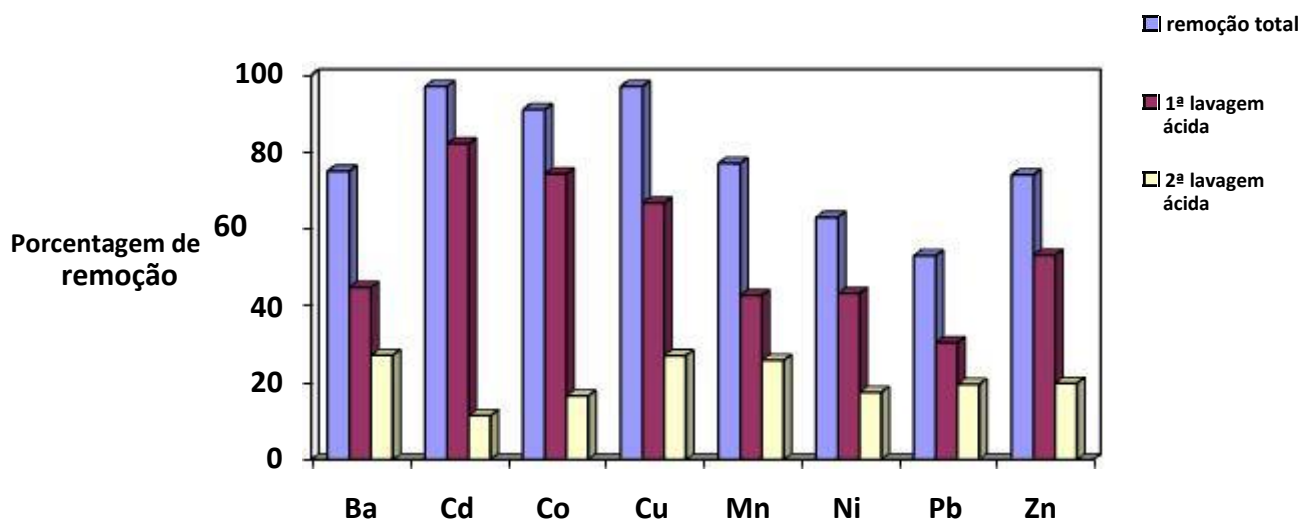


Figura 19. Porcentagens de remoção dos elementos no tratamento do argilomineral nas etapas utilizando extrator.

Na figura 19 podem ser observadas as porcentagens de remoção total do tratamento do argilomineral (do tratamento todo, ou seja, com duas lavagens ácidas) e as porcentagens de remoção parciais de cada lavagem com ácido nítrico. Verifica-se que a primeira lavagem ácida é mais eficiente na remoção dos metais da MT; porém as porcentagens de remoção de metais na segunda lavagem são significativas, mostrando-nos que esta possui grande importância no tratamento do argilomineral.

Através dos dados ilustrados nas Figuras 18 e 19 observa-se que as concentrações dos elementos eluídos do argilomineral tratado foram inferiores às concentrações de elementos eluídos do argilomineral *in natura*, com porcentagens de remoção acima de 70% para a maioria dos elementos, confirmando assim a alta eficiência do tratamento proposto e a possibilidade de usar este material como fase sorvente no DGT.

4.2 - Estudo de sorção e dessorção de íons metálicos em montmorilonita

A capacidade de retenção dos elementos pela fase sorvente e posterior capacidade de dessorção são essenciais na aplicação do argilomineral para esta função no dispositivo. Assim, fez-se necessário um estudo da sorção e dessorção realizado pela MT nos elementos de interesse.

A sorção caracteriza-se pelo acúmulo de um íon ou composto na superfície de um sólido. Esse processo físico-químico é influenciado por diversos fatores, tais como: características e propriedades do material a ser sorvido e ainda do agente sorvente e pelas condições encontradas no meio. (Bhattachayya e Gupta, 2008; Rezende *et al.*, 2010).

Uma vez que o argilomineral utilizado como fase sorvente passou por um tratamento ácido prolongado antes de sua comercialização, sua estrutura pode ter sido afetada; porém para confirmação desta hipótese faz-se necessário um estudo de caracterização deste material. Assim, os metais podem ter sido realmente sorvidos pela montmorilonita, seja em sua superfície ou lamelas, ou ainda por óxidos resultantes do tratamento ácido deste argilomineral.

Para avaliar a capacidade sortiva da MT fez-se um estudo frente a diversas condições de concentração dos elementos, pH e força iônica do meio a fim de caracterizar o grau de interação da MT com as espécies metálicas frente a situações diversas que possam vir a ser encontradas nos meios onde os dispositivos serão aplicados.

Uma massa de 100 mg de argilomineral ficou em contato com a solução multielementar, com pH e força iônica ajustados, por 24 h. Após este período, foi feita uma centrifugação e o sobrenadante foi retirado para determinação da concentração de íons não-sorvidos pela MT; a diferença entre as concentrações iniciais e as concentrações de íons não sorvidos nos deram as concentrações de íons sorvidos. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 3 na forma de porcentagem de sorção das espécies metálicas pela MT.

Tabela 4. Porcentagens de sorção dos elementos na MT em diversas condições.

Ensaio Concentração / pH / Força Iônica (mol L ⁻¹ de NaNO ₃)	% de sorção							
	Ba	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
10 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,01	58	51	71	> 90	40	44	70	79
10 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,01	58	53	71	>90	41	43	68	78
10 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,01	58	57	65	>90	44	39	67	77
10 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,05	55	35	81	>90	40	40	70	83
10 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,05	56	41	79	>90	43	38	70	81
10 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,05	56	45	79	>90	43	36	68	81
10 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,1	54	37	75	>90	36	36	73	83
10 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,1	56	38	74	>90	35	33	72	83
10 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,1	58	39	71	>90	38	33	70	82
30 µg L ⁻¹ / pH = 5 / 0,001	64	92	90	98	85	90	90	70
30 µg L ⁻¹ / pH = 5 / 1,0	46	12	21	97	15	19	85	98
50 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,01	73	88	87	96	75	82	75	90
50 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,01	72	88	86	96	76	80	74	89
50 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,01	72	88	86	94	77	80	73	88
50 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,05	68	85	86	93	64	80	73	93
50 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,05	69	85	85	92	68	79	73	93
50 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,05	73	86	84	91	69	80	73	92
50 µg L ⁻¹ / pH = 6 / 0,1	66	85	82	90	62	78	78	96
50 µg L ⁻¹ / pH = 7 / 0,1	67	86	81	88	63	78	77	94
50 µg L ⁻¹ / pH = 8 / 0,1	69	86	81	88	63	78	76	94
Média	62	64	77	> 93	54	58	74	86

Este experimento é semelhante aquele realizado por Vanessa Egéa dos Anjos (Anjos, 2010) em seu trabalho de doutorado desenvolvido no âmbito do GQA. O estudo foi realizado de maneira multivariada utilizando planejamento fatorial do tipo 2³, sobre a influência do pH, força iônica e da concentração dos elementos no seu processo de interação com os argilominerais, para estabelecer as melhores condições de sorção e determinar as condições de contorno e limite para uso nos dispositivos DGT. De um modo geral, ficou evidente que existem diferenças no processo de interação entre os elementos com os argilominerais e nota-se que as sorções foram influenciadas de maneira pronunciada pelas condições experimentais.

Os experimentos foram repetidos neste trabalho porque um lote diferente da MT foi utilizado. Além disso, condições de mais baixa ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) e mais alta ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) força iônica também foram estudadas neste trabalho. Estas novas condições foram avaliadas dado que existe consenso sobre limitações no emprego de dispositivos DGT sob condições de baixa força iônica e baixo pH (Inap, 2002). Devido a limitações operacionais apenas algumas condições foram realizadas em triplicata, com incertezas nunca superiores a 10%.

Nota-se na tabela acima que em alguns casos dos ensaios de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a porcentagem de sorção foi superior a 90 %, ou seja, concentrações do elemento no sobrenadante (não-sorvido) inferiores ao limite de quantificação do método de determinação, $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Assim, não se pode afirmar a porcentagem exata de sorção e sim estimá-la como sendo acima de 90 %.

Observa-se que, de um modo geral, a capacidade sortiva da MT foi diferenciada, dependendo do metal e das características do meio. A porcentagem de sorção, considerando todas as condições experimentais estudadas, obedeceu à ordem que segue: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Co} \sim \text{Pb} > \text{Cd} \sim \text{Ba} \sim \text{Ni} \sim \text{Mn}$, variando de mais de 90% para cobre a 54 % para o manganês. A variação de porcentagem foi mais pronunciada de um metal para outro do que de uma condição para outro em um mesmo metal. Ainda de modo geral, as porcentagens de sorção variaram de maneira mais expressiva quando em condições extremas de força iônica (mais baixa e mais alta) e pH mais baixo.

As porcentagens de sorção em Anjos (2010) obedeceram a ordem que segue: $\text{Cu} > \text{Cd} \sim \text{Pb} > \text{Co} \sim \text{Zn} \sim \text{Ni} > \text{Mn} > \text{Ba}$, variando de 97% para cobre a 47% para o bário. Comparando com os resultados obtidos por Anjos e os obtidos neste trabalho, a faixa de sorção foi semelhante e a ordem variou minimamente, exceto para Cd e Zn.

Em relação à força iônica do meio, a maior concentração de Na^+ presente em solução, oriunda das condições de força iônica elevada, pode aumentar a competição com os metais por sítios de interação diminuindo assim a sorção dos elementos de interesse no argilomineral, fato explicado por Zhang

e Davison (2000) para a sorção de alguns elementos na fase sorvente do dispositivo comercial. Esta influência ocorre para metais como o cádmio, manganês e níquel; pois nestes casos o mecanismo de sorção deve -se as atrações eletrostáticas. Para o chumbo e zinco a influência ocorre de modo inverso, uma vez que a sorção é favorecida com o aumento da força iônica do meio, devido à interação dos metais com o argilomineral não ocorrer de forma eletrostática e sim a partir de ligações químicas estabelecidas dos íons com a montmorilonita (Zhang e Hou, 2008). Já o cobre não sofre influência significativa da variação da força iônica, sugerindo assim uma maior interação deste metal com o argilomineral.

A maior presença de íons H^+ em solução pode ocasionar temporariamente a formação de sítios de carga positiva, pela associação destes íons com O^- e OH^- localizados na superfície do argilomineral, podendo diminuir a sorção de metais em argilominerais devido à competição com os íons H^+ (Puls e Lins, 2003; Mohapatra *et al.*, 2007;). Na faixa de pH trabalhada nos experimentos deste trabalho, de 6 a 8, a sorção não é muito afetada por esta variação no pH.

Por fim, o aumento da concentração dos metais afetou positivamente a sorção destes na montmorilonita.

Essas tendências variam de metal para metal, uma vez que dependem da interação do argilomineral com o metal, de acordo com as características e propriedades dos metais e do argilomineral, da concentração do metal, de condições do meio (pH, temperatura, força iônica), tempo e forma de contato entre eles, da natureza e característica do sorvente, presença e concentração de ligantes e eletrólitos (Aguiar *et al.*, 2002; Bhattacharyya e Gupta, 2008).

Após a avaliação do processo de sorção, testou-se a eficiência do processo de dessorção dos metais do argilomineral empregando o ácido nítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A porcentagem de recuperação está descrita na Tabela 5, de forma resumida.

Tabela 5. Porcentagem de recuperação no processo de dessorção.

Elemento	% de recuperação na dessorção
Ba	85 – 97
Cd	85 – 93
Co	87 – 95
Cu	93 – 97
Mn	99- 103
Ni	92 – 94
Pb	91 – 93
Zn	95 – 97

De acordo com os valores descritos na Tabela 5, verifica-se a alta eficiência do processo de dessorção, com porcentagens de recuperação variando de 85 a 103%, com incertezas sempre inferiores a 10%. Assim, comprova-se a alta capacidade do extrator escolhido e a montmorilonita mostra-se apta para ser utilizada no dispositivo modificado uma vez que o material sorvente precisa não somente possuir altas porcentagens de sorção dos elementos, mas também liberá-los de maneira satisfatória.

4.3 - Aplicação do dispositivo DGT-MT em estudos ecotoxicológicos

4.3.1 – Efeito dos sólidos suspensos totais na labilidade das espécies metálicas (SST)

Previamente à aplicação dos dispositivos nos testes de toxicidade frente a peixes foi feita uma avaliação acerca do comportamento das espécies metálicas lábeis em função da variação dos teores de sólidos suspensos totais,

devido à presença das rações utilizadas na alimentação dos animais. Também foi avaliada alguma possível alteração na concentração total dos metais a partir de uma contribuição da própria ração utilizada.

O ensaio foi realizado em um sistema modelo em um período de sete dias, com a aplicação de um dispositivo DGT a cada 24 horas, de modo semi-estático, ou seja, semelhante ao utilizado nos ensaios ecotoxicológicos. No momento da reposição da água retirada e também da troca do DGT foi coletada alíquota da solução para análise gravimétrica de SST. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: teores de SST e concentrações de metais lábeis determinadas

Dia	SST (mg L ⁻¹)	Concentração lábil (µg L ⁻¹)			
		Cd	Cu	Pb	Zn
1	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0
1	2,0	0,70	0,83	0,66	0,90
2	3,2	0,70	0,74	0,63	0,78
3	5,4	0,63	0,6	0,59	0,69
4	8,7	0,61	0,58	0,51	0,61
5	10,2	0,54	0,49	0,48	0,42
6	12,3	0,51	0,42	0,42	0,32
7	13,1	0,46	0,38	0,40	0,30

Na tabela acima se verifica os valores de concentração lábil das espécies metálicas bem como os valores de SST nos sete dias do estudo. O primeiro dado do dia 1 refere-se à concentração inicial adicionada anteriormente a adição de ração.

Estas variações da concentração de metal lábil para todos os elementos a partir do acréscimo dos teores de SST no meio são ilustrados na Figura 20.

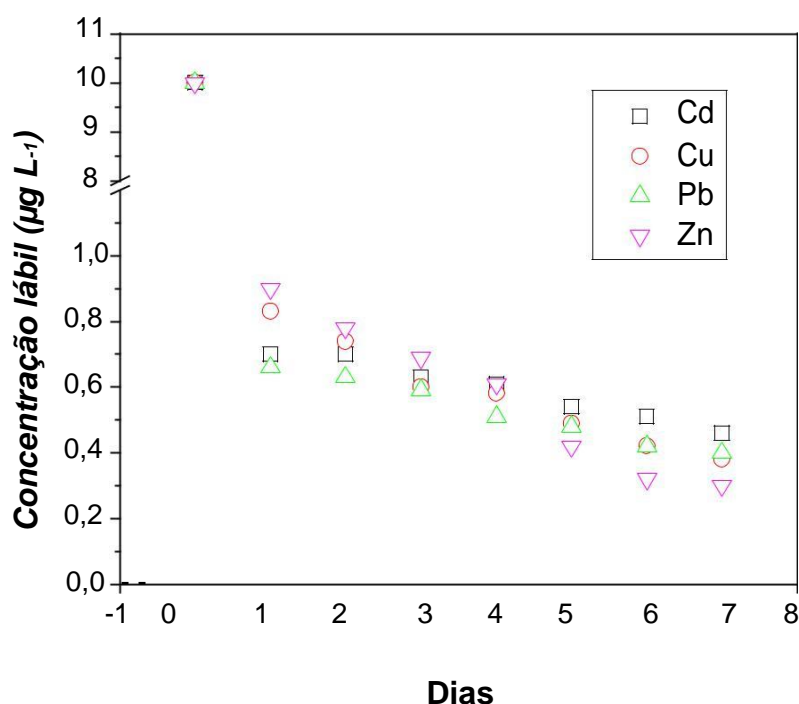


Figura 20: Variação da concentração de metal lábil com o aumento da concentração de SST.

Verificou-se, de maneira geral, uma tendência de decaimento da concentração de metal lábil com o aumento da concentração de SST no meio. Os teores de SST foram crescentes ao longo dos dias, sendo o menor valor referente ao primeiro dia de teste e o maior valor referente ao último dia. Observou-se uma queda brusca na concentração de metal lábil já no primeiro dia, decaindo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para $0,66 \mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo, por exemplo. As concentrações das frações lábeis foram decrescendo com o passar dos dias, e consequente aumento nos teores de SST, passando de $0,83 \mu\text{g L}^{-1}$ após 24 horas para $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$ ao final do sétimo dia, para o cobre por exemplo. Comparando os resultados obtidos, as frações lábeis de chumbo e de cádmio tiveram uma queda mais brusca no primeiro dia de teste, com decaimento menos expressivos ao longo dos outros dias; já as frações lábeis de cobre e zinco tiveram diferenças mais expressivas entre os dias do teste.

Esta tendência de decaimento da concentração lábil em função do aumento dos teores de SST pode ser explicada a partir de um processo conhecido como partição. A partição das espécies metálicas nos meios aquáticos, entre as fases dissolvida e particulada, influencia seu transporte, reatividade e biodisponibilidade. A presença de ligantes no meio interfere diretamente a partição, que no material particulado em suspensão podem ser minerais, microorganismos, tecidos biológicos, partículas orgânicas e partículas inorgânicas cobertas por material orgânico (Melo *et al.*, no prelo; Scheffer *et al.*, 2007; Anjos *et al.*, 2010). A distribuição das espécies entre as fases solúvel e particulada depende de parâmetro como pH, teor de matéria orgânica dissolvida, alcalinidade, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração e composição do material particulado, além da forma química do metal dissolvido e do tipo de processo interativo (sorção/dessorção ou mecanismo de precipitação controlada). A partição dos metais é fortemente afetada pela presença da matéria orgânica, pois além da formação de complexos solúveis com os metais, os sólidos suspensos naturais também podem conter uma cobertura orgânica, que oferece à superfície importantes características na troca dos íons metálicos entre a fase sólida e a solução. Como os íons metálicos livres hidratados encontram-se dissolvidos, eles são adsorvidos na superfície do material particulado, passando da fase dissolvida para a fase particulada. Esta adsorção geralmente ocorre através de interações fracas do tipo Van der Waals. Após este processo, o metal, juntamente com o sólido no qual está adsorvido, é retirado da coluna d'água depositando-se no fundo do corpo d'água (de Barros *et al.*, 2006; Scheffer, 2006).

Uma vez adsorvido ao material em suspensão, o metal passa a não estar biodisponível (metal livre hidratado ou fracamente complexado) para as espécies aquáticas, uma vez que nesta forma seu transporte através da membrana celular é difícil (Anjos, 2010).

Este estudo é de grande valia uma vez que a partir dele confirma-se a ineficiência dos ensaios ecotoxicológicos de maneira estática, uma vez que a fração realmente responsável pelos efeitos ecotoxicológicos estudados não é constante.

4.3.2 – Estudos ecotoxicológicos de metais em aquários

Dispositivos DGT modificados foram utilizados em estudos ecotoxicológicos a fim de quantificar a fração biodisponível dos metais nos aquários, esta responsável pelos possíveis efeitos causados nos peixes expostos a contaminação.



Figura 21: Aplicação do dispositivo em aquários.

Vale salientar que os resultados obtidos nos bioensaios foram discutidos ao final da apresentação de todos os resultados, uma vez que estes se mostraram semelhantes.

• **Cobre em peixes da espécie *Rhamdia quelen* – Jundiá**
para alterações morfológicas nucleares e danos ao DNA

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos do cobre em peixes popularmente conhecidos como Jundiá, através de possíveis alterações morfológicas nucleares e lesões no DNA. Os aquários foram contaminados por 96 h e cada DGT ficou exposto por 24 horas.

Como este bioensaio foi o primeiro realizado pelo nosso grupo de pesquisa e como já estava planejado pelo Laboratório responsável pelas análises biológicas, as concentrações adicionadas inicialmente referem-se à valores de CuCl_2 e não de Cu^{2+} . Assim, as concentrações de cobre adicionadas foram $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$, $4,25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8,5 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Os ensaios seguintes já foram realizados levando em consideração a concentração de metal na forma iônica e não como sal.

- **BIOENSAIO 1 – JUNDIÁ**

As concentrações de cobre lábil determinadas neste ensaio bem como os teores de SST estão expostas na tabela a seguir.

Tabela 7: Concentrações iniciais de cobre, tempo de exposição do DGT e concentrações de cobre lábil determinadas

Concentração add CuCl_2	Concentração add Cu^{2+}	Período de contato	Concentração Cu lábil
$2 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,95 \mu\text{g L}^{-1}$	0-24 h	-
$2 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,95 \mu\text{g L}^{-1}$	24-48 h	-
$2 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,95 \mu\text{g L}^{-1}$	48-96 h	-
$9 \mu\text{g L}^{-1}$	$4,25 \mu\text{g L}^{-1}$	0-24 h	$0,18 \mu\text{g L}^{-1}$
$9 \mu\text{g L}^{-1}$	$4,25 \mu\text{g L}^{-1}$	24-48 h	$0,16 \mu\text{g L}^{-1}$
$9 \mu\text{g L}^{-1}$	$4,25 \mu\text{g L}^{-1}$	48-96 h	$0,09 \mu\text{g L}^{-1}$
$18 \mu\text{g L}^{-1}$	$8,50 \mu\text{g L}^{-1}$	0-24 h	$0,57 \mu\text{g L}^{-1}$
$18 \mu\text{g L}^{-1}$	$8,50 \mu\text{g L}^{-1}$	24-48 h	$0,29 \mu\text{g L}^{-1}$
$18 \mu\text{g L}^{-1}$	$8,50 \mu\text{g L}^{-1}$	48-96 h	$0,15 \mu\text{g L}^{-1}$

Nota-se uma variação na concentração de cobre lábil, ao longo do experimento. Na figura a seguir podemos observar mais claramente este decaimento de concentração lábil.

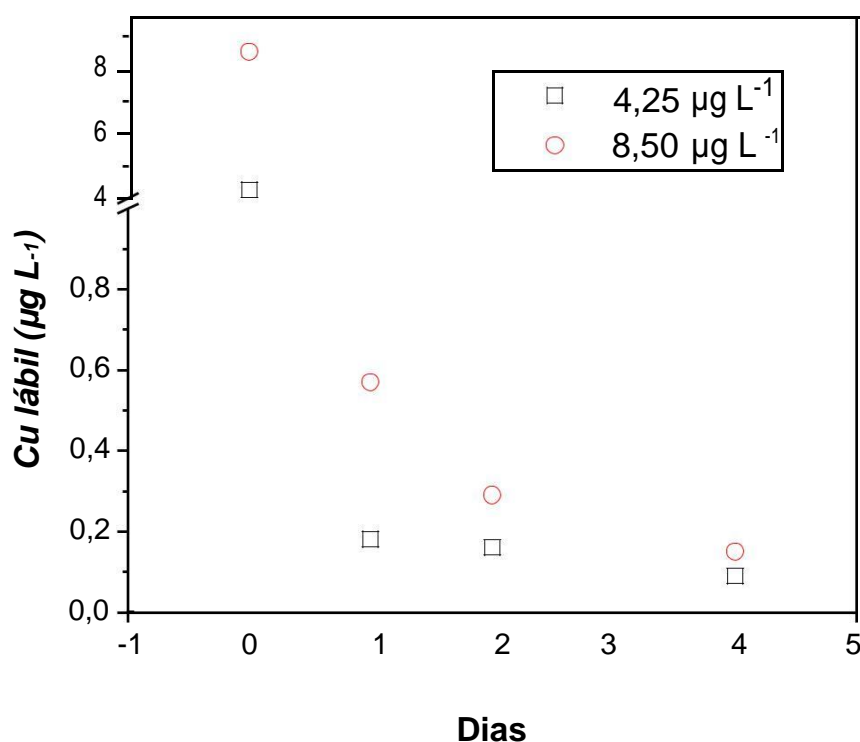


Figura 22. Variação da concentração de cobre lábil com o decorrer do tempo.

As frações de cobre lábil decaíram de 4,25 µg L⁻¹ para 0,09 µg L⁻¹ e de 8,5 µg L⁻¹ para 0,15 µg L⁻¹, com decaimentos graduais ao longo dos bioensaios. A ausência de resultados de concentração de cobre lábil para o experimento com a concentração de 2,0 µg L⁻¹ de CuCl₂ ocorreu pois as concentrações lábeis foram inferiores ao limite de quantificação para o cobre no método de determinação empregado (1,0 µg L⁻¹).

• **Cobre em peixes das espécies *Astyanax fasciatus* – Lambari e *Cyprinus carpio* - Carpa para mecanismos de reparo**

Nestes ensaios, após o período de sete dias de contaminação com cobre, os peixes foram mantidos nos aquários por mais 30 dias para estudo dos mecanismos de reparo dos peixes popularmente conhecidos como Lambari e Carpa. Neste período sem contaminação, o sistema semi -estático foi mantido para retirada de excesso de material sólido dos aquários.

- BIOENSAIO 2 - LAMBARI

As concentrações de cobre lábil bem como as concentrações de SST para o bioensaio 2 estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 8: teores de SST e concentrações de cobre lábil determinadas no bioensaio 2.

Dia	Concentração lábil ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SST (mg L^{-1})
1	0,98	1,0
2	0,90	1,4
3	0,81	4,0
4	0,63	4,2
5	0,54	5,5
6	0,42	7,2
7	0,36	9,9

Observa-se um aumento dos teores de SST e um conseqüente decaimento da concentração de cobre lábil ao longo do experimento, como pode ser visto na figura 23.

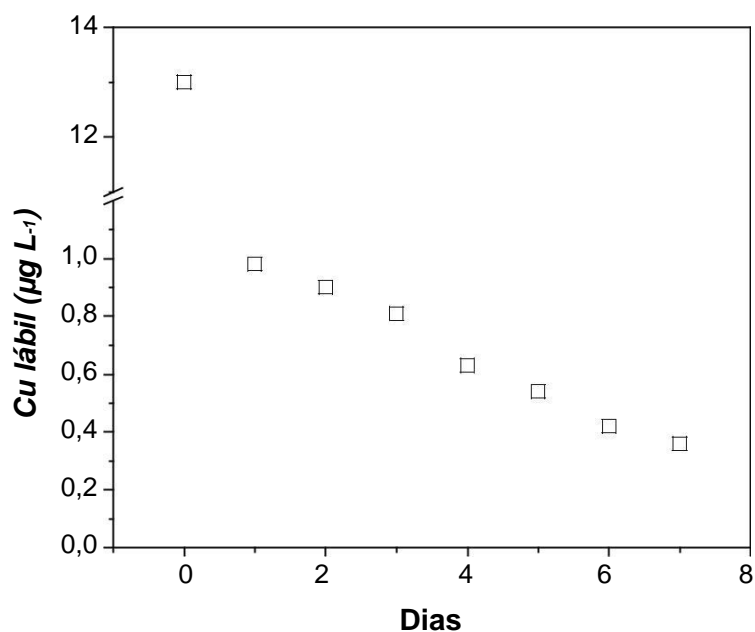


Figura 23: variação da concentração de cobre lábil ao longo do bioensaio 2.

- BIOENSAIO 3 - CARPA

Os resultados obtidos de concentração de cobre lábil neste bioensaio assim como os teores de SST estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: teores de SST e concentrações de cobre lábil determinadas no bioensaio 3.

Dia	Concentração lábil (µg L ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)
1	1,41	0,7
2	1,39	0,9
3	1,30	1,1
4	1,27	1,8
5	1,14	2,5
6	1,09	4,3
7	0,96	5,4

Para o experimento com carpas ocorreu a mesma tendência de decaimento de concentração de cobre lábil ao longo do bioensaio, à medida que nota-se aumento dos teores de SST no aquário. Esta relação está ilustrada na figura a seguir.

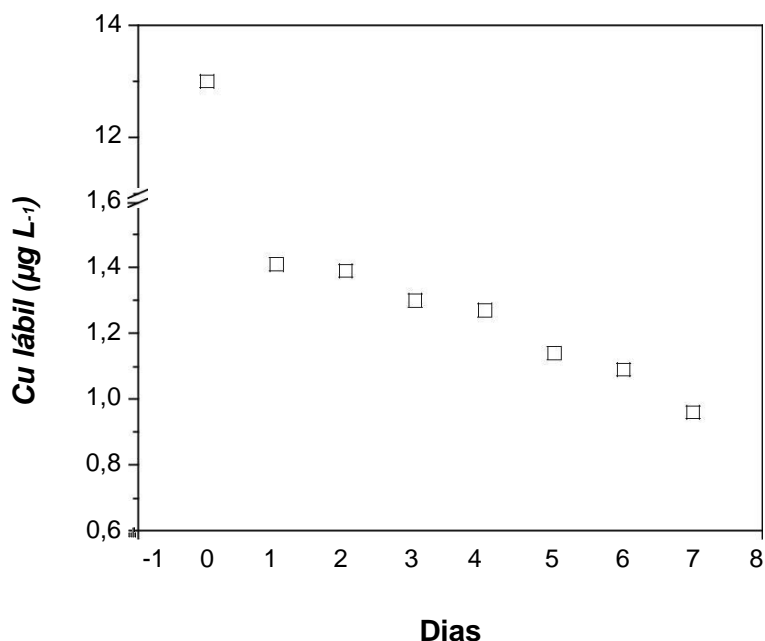


Figura 24: variação da concentração de cobre lábil ao longo do bioensaio 3.

No caso do ensaio com Lambari, a concentração de cobre decaiu de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ para $0,98 \mu\text{g L}^{-1}$ no primeiro dia de teste, chegando a atingir $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ no último dia. Para o ensaio com Carpas, a concentração de cobre decaiu de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ para $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ no primeiro dia, alcançando o valor de $0,96 \mu\text{g L}^{-1}$ ao acabar o período de contaminação. Explica-se o fato através dos valores encontrados de SST, uma vez que para o ensaio com Carpas o valor chega a ser 1/3 dos valores encontrados para os ensaios com Lambaris.

A diferença das espécies acarreta em mudanças significativas nos ensaios. Por exemplo, a adição da ração inteira ou triturada e a quantidade de ração adicionada, ou ainda na quantidade e tamanhos dos excrementos dos indivíduos. Essas mudanças acarretam numa distinção nos teores de SST de um ensaio para outro. No entanto, é importante mencionar que o SST

aumentou em todos os casos, com o passar do tempo, independentemente do tipo de peixe e forma de alimentação.

*** Chumbo em peixes da espécie *Rhamdia quelen*– Jundiá para níveis de estresse - hormônios**

Para o estudo dos níveis de estresse causado pela contaminação com chumbo em peixes popularmente conhecidos como Jundiá, através de análises hormonais, foram realizados três bioensaios:

- *Bioensaio 4*: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo durante sete dias.
- *Bioensaio 5*: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo durante 15 dias.
- *Bioensaio 6*: 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo durante 15 dias.

- BIOENSAIO 4

Os resultados obtidos neste teste estão expostos na tabela 10.

Tabela 10: concentrações de chumbo lábil e respectivos valores de SST no bioensaio 4.

Dia	Concentração lábil ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SST (mg L^{-1})
1	0,57	1,0
2	0,54	2,0
3	0,52	4,5
4	0,51	7,1
5	0,49	10,2
6	0,45	11,0
7	0,37	14,3

É possível verificar, através dos resultados obtidos neste bioensaio, um decaimento da concentração de chumbo lábil ao longo dos dias, com um visível acréscimo nos teores de SST. Esse decaimento está ilustrado na figura 25.

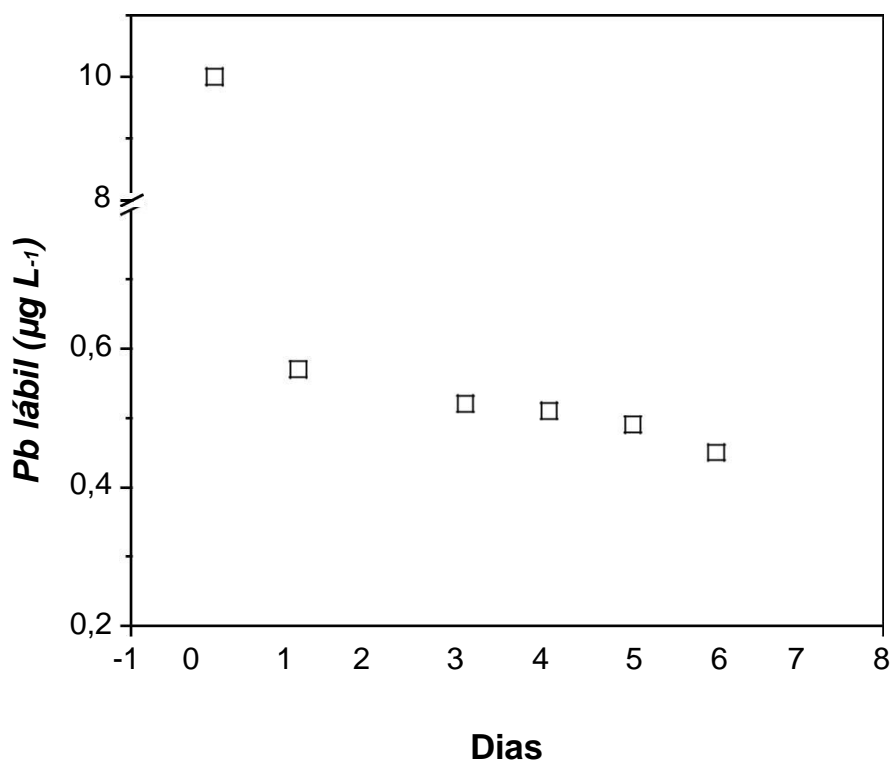


Figura 25: Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 4.

A fração lábil decaiu de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para $0,57 \mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo no primeiro dia de ensaio, chegando a atingir $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ ao fim do teste.

- *BIOENSAIO 5*

No bioensaio 5, a concentração inicial de chumbo foi de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e o experimento durou 15 dias. Os resultados obtidos neste teste estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11: concentrações de chumbo lábil e respectivos valores de SST no bioensaio 5.

Dia	Concentração lábil ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SST (mg L^{-1})
1	0,49	1,8
5	0,40	3,0
8	0,35	4,5
12	-	15,1
15	-	24,2

É possível verificar, através dos resultados obtidos neste bioensaio, um decaimento da concentração de chumbo lábil ao longo dos dias, com um visível acréscimo nos teores de SST. As concentrações de chumbo lábil nos dias 12 e 15 foram inferiores ao limite de quantificação para o chumbo no método proposto. Esse decaimento está ilustrado na figura 26.

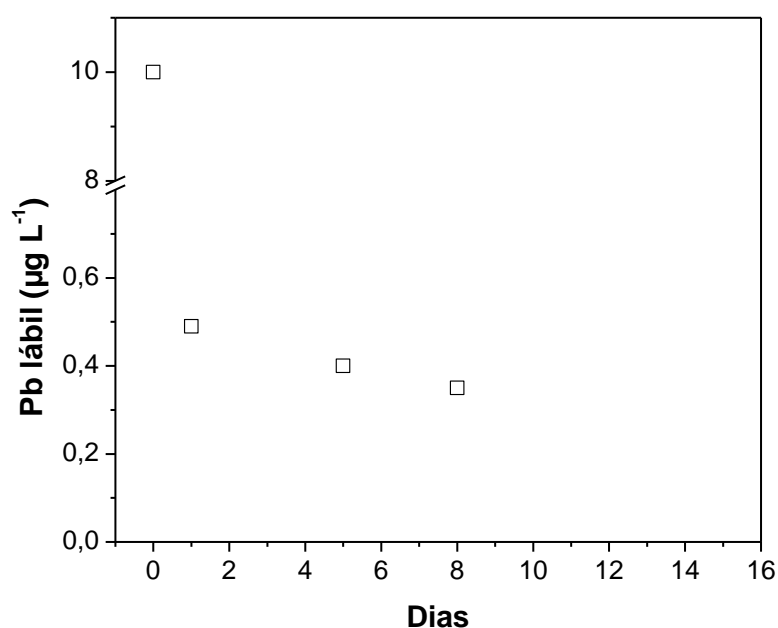


Figura 26: Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 5 .

- BIOENSAIO 6

Neste bioensaio os aquários foram contaminados com chumbo em uma concentração inicial de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Este experimento ocorreu simultaneamente ao bioensaio 5, nas mesmas condições, exceto na concentração inicial de chumbo. Os teores de SST assim como as concentrações de chumbo lábil determinadas estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 12: concentrações de chumbo lábil e respectivos valores de SST no bioensaio 6.

Dia	Concentração lábil ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SST (mg L^{-1})
1	5,87	1,8
5	5,24	5,0
8	5,49	6,5
12	4,71	18,1
15	4,28	23,2

Assim como no restante dos bioensaios, neste pode-se também observar um decaimento da concentração de chumbo lábil ao longo dos dias, com um visível acréscimo nos teores de SST. Esse decaimento está ilustrado na Figura 27.

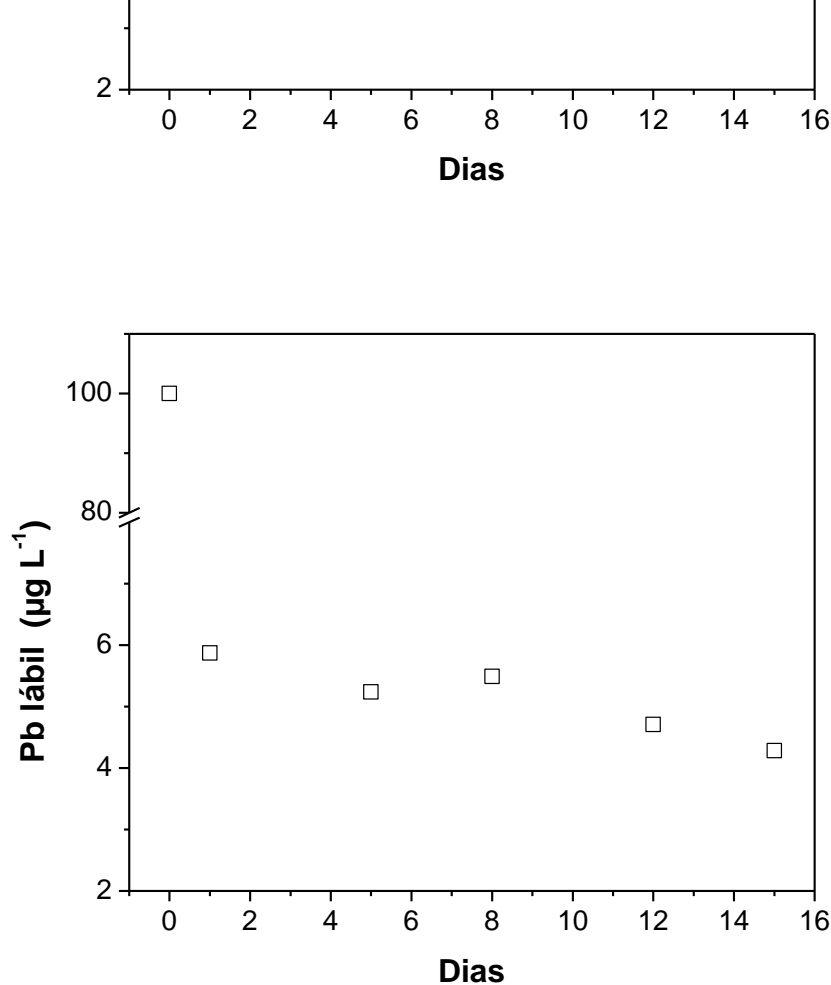


Figura 27: Variação da concentração de chumbo lábil ao longo do bioensaio 6.

Para os bioensaios 5 e 6, foram determinadas concentrações totais recuperáveis (MTR) e concentrações totais dissolvidas (MTD). Estas concentrações foram determinadas por ICPOES, após digestão fotoquímica ativada por microondas. Estes dados e as concentrações lábeis (ML) estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 13: Resultados obtidos nas determinações das concentrações totais de chumbo nos bioensaios 5 e 6.

Dia	Bioensaio 5			Bioensaio 6		
	MT _R (µg L ⁻¹)	MT _D (µg L ⁻¹)	ML (µg L ⁻¹)	MT _R (µg L ⁻¹)	MT _D (µg L ⁻¹)	ML (µg L ⁻¹)
1	9,82	3,45	0,49	100,83	43,57	5,87
5	9,10	1,02	0,40	92,37	21,25	5,24
8	10,04	-	0,35	98,43	13,40	5,49
12	9,22	-	-	91,82	7,76	4,71
15	9,87	-	-	87,32	4,37	4,28

Os valores não descritos na tabela encontraram -se abaixo do LQ ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) do método de determinação proposto. As concentrações totais encontradas foram similares as concentrações iniciais adicionadas. A faixa de recuperação variou de entre 87 % e 101%, podendo ser considerada satisfatória.

Através dos dados obtidos podemos verificar uma baixa fração de metal em sua forma dissolvida, sendo assim majoritariamente encontrado na sua forma particulada. Ainda pode-se observar um decaimento da concentração de metal na fase dissolvida ao longo do experimento, mostrando que com o passar do tempo o metal passa da fase dissolvida para a particulada, diminuindo consequentemente a fração lábil.

Como houve uma tendência similar em todos os ensaios, tanto para concentração de metal lábil como para teores de SST, a discussão dos resultados será feita de modo geral. Em todos os ensaios ecotoxicológicos houve um aumento do teor de sólidos suspensos totais nos aquários com o passar do tempo, seja pela excreção dos peixes ou pela adição de ração para alimentação dos mesmos; notou-se ainda que a concentração de metal lábil decaiu frente a este aumento de SST no meio. Resultados já esperados uma vez realizado anteriormente o teste de SST.

Comparando os metais, a fração lábil de chumbo decaiu mais bruscamente num primeiro momento do que a fração lábil de cobre; porém do segundo dia de ensaio em diante este decaimento foi mais discreto para o chumbo. Estas diferenças provavelmente se dão em função das diferenças nas características dos metais, influenciando a interação com os SST. Em um estudo envolvendo os metais Cd, Cu Pb, e Zn, Anjos *et al.* (2010) mostraram que os metais podem se comportar de maneira parecida, agrupando-se o cádmio e o chumbo e o cobre com o zinco, comparando suas frações lábeis. Em trabalho realizado com camarões, de Barros *et al.* (2006) constatou que os valores de cobre foram menores em períodos de engorda, ou seja, períodos com adições de porções maiores de ração nos viveiros. Segundo Sodré *et al.* (2004), no Rio Iraí, apenas 6% do cobre encontra-se na sua forma lábil e no Rio Iguaçu apenas 3%. Esta diferença de porção lábil nos rios é explicada pela diferença nas características dos meios, pois o Rio Iguaçu

apresenta maiores teores de sólidos suspensos totais, que contribuem para uma diminuição na concentração de cobre lábil.

O cobre é o metal mais utilizado em estudos ecotoxicológicos, sendo considerado um dos metais mais tóxicos aos animais aquáticos. A alta toxicidade do cobre nos peixes pode ser explicada pela alta afinidade deste metal com os sítios de ligação presentes no epitélio branquial dos peixes, ocasionando diminuição da capacidade de absorção de outros íons. Outro aspecto que explica seu amplo uso em bioensaios é a grande aplicabilidade deste metal em diversos setores industriais, o que aumenta seu aporte nos corpos d'água (Martins e Bianchini, 2008; Dal Ponte *et al.*, 2009,).

Anjos (2010) aplicou dispositivos DGT-MT em amostra de água natural coletada do Rio Iguaçu, com teores de SST de $13,9 \text{ mg L}^{-1}$ e pH 7.08. Obtendo valores de MTR, MTD, MPART e ML observou-se que o chumbo encontra-se majoritariamente em sua forma particulada, ou seja, em uma forma pouco biodisponível uma vez removido da coluna d'água. Este mesmo trabalho mostra ainda que a labilidade do cobre e do chumbo decai com o tempo, na aplicação do DGT-MT em um sistema modelo: para o cobre, a fração lábil representa 52% do total em 6 horas de experimento decaindo para 8% do total em 72 horas; para o chumbo, a fração lábil representa 66% do total em 6 horas de experimento decaindo para 3% do total em 48 horas.

Os metais interagem com o material particulado em suspensão e com o material orgânico dissolvido formando espécies não biodisponíveis, estas de difícil transporte através na membrana celular dos organismos vivos. Assim, pode-se dizer de antemão que em ambientes com altos teores de SST os efeitos tóxicos das espécies metálicas sejam menores. Os efeitos toxicológicos causados pelo cobre lábil e pelo chumbo lábil nos peixes ainda estão sendo avaliados pelo Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental e pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental.

Assim, verificou-se a importância da especiação química uma vez que a fração lábil foi determinada, sendo esta a verdadeira responsável por possíveis efeitos tóxicos frente aos peixes.

Além disso, ao verificarmos a variação da concentração de metal lábil podemos iniciar um estudo relacionando concentração da fração lábil com teores de material particulado e matéria orgânica para ensaios ecotoxicológicos. Estes, hoje realizados baseados na concentração de metal total, não levando em consideração a partição e/ou a especiação química dos íons metálicos, ou ainda com auxílio de modelos matemáticos, como por exemplo, o Modelo do Ligante Biótico (BLM), utilizado para predizer o efeito tóxico dos metais em espécies aquáticas. O uso do DGT em ensaios ecotoxicológicos insere a especiação química nestes bioensaios, trazendo como benefícios todas as vantagens de uma técnica *in situ* e ainda incluindo aos resultados os valores reais de concentração de metal biodisponível às espécies aquáticas, sem a necessidade do conhecimento de uma ampla gama de parâmetros físico-químicos do meio que o BLM exige.

Vale ainda ressaltar que o sistema utilizado nestes bioensaios e na grande maioria dos ensaios ecotoxicológicos descritos na literatura baseia-se em sistemas semi-estáticos de exposição, sendo este um sistema que não garante a constância da concentração total dos metais uma vez que há retirada e reposição de 1/3 do volume do aquário. Este pode ser ainda um dos motivos do decaimento da concentração lábil, uma vez que há variação da concentração total. Assim, para melhores resultados o ensaio ecotoxicológico deveria ser realizado utilizando o sistema de exposição de fluxo-contínuo, que mantém a concentração constante, juntamente com dispositivos DGT-MT para análise de especiação.

4.3.3. – Resultados preliminares dos efeitos causados pela contaminação com cobre em ensaios ecotoxicológicos

Para ilustrar a aplicabilidade do DGT em ensaios ecotoxicológicos, resultados de análises dos efeitos causados pela contaminação com cobre em peixes serão abordados.

Os resultados abaixo expostos são referentes aos bioensaios 2 e 3, com contaminação com cobre em aquários contendo Lambari e Carpa, respectivamente. Os experimentos tiveram um tempo de duração de 30 dias, com sete dias de contaminação e o restante sem contaminação para detecção dos mecanismos de reparo.

Os dispositivos DGT foram expostos por 24 horas cada, para determinação da fração lábil de cobre. Diariamente, peixes foram sacrificados para análise do efeito causado por esta contaminação. Para isto, foram realizados Ensaios Cometa.

O teste do cometa se baseia na detecção, sob condições alcalinas, de fragmentos de DNA que na eletroforese migram do core nuclear muito mais rapidamente do que o DNA intacto, resultando na formação de um cometa com cauda. É utilizado para lesões genômicas (DNA) e permite a detecção de danos e seu reparo em uma célula (Tice, 1995). É um teste que pode ser utilizado em estudos de reparo de DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Gontijo e Tice, 2003). O Cometa é amplamente aplicado na literatura em estudos de toxicogenética e suas vantagens incluem: mensuração de danos em células individuais; o baixo número de células necessário para a realização do teste; possibilidade de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada e ser um método sensível para detectar danos no DNA, além de sua rapidez, ser relativamente econômico, preciso e reproduzível, e apresentar-se como um sistema-teste adequado para o biomonitoramento ambiental e na genética toxicológica (Lee e Steinert, 2003).

A imagem resultante do Ensaio Cometa para o bioensaio com Carpa está exemplificada na figura 28.

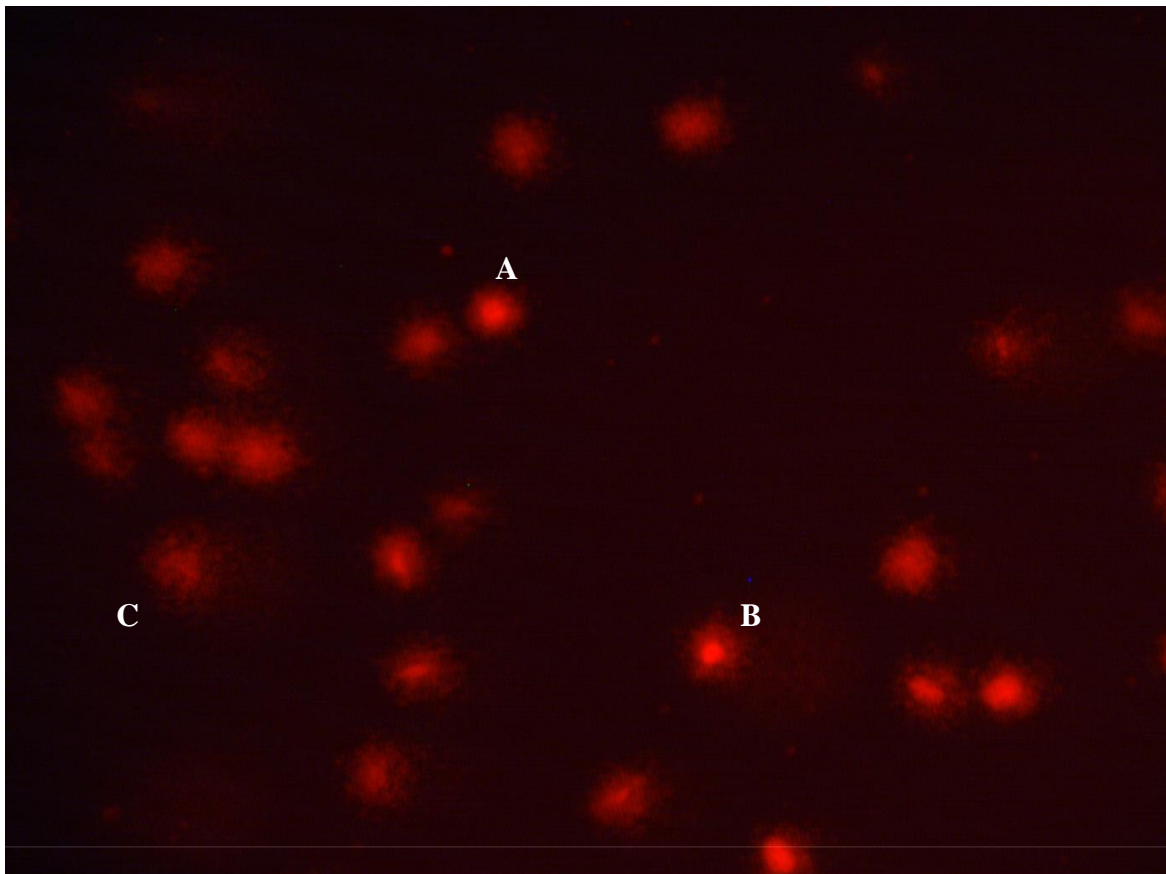


Figura 28: Ensaio Cometa para o bioensaio 3 (fornecida pelo Laboratório de citogenética animal e mutagênese ambiental).

A figura acima ilustra a formação de cauda após dano na célula, obedecendo à seguinte ordem de dano: $C > B > A$. Quanto maior o tamanho da cauda em relação à cabeça, maior é o dano.

Com este dado é calculado o Score utilizado no gráfico de resultados, com danos de 0-4, zero (sem dano) a quatro (maior nível de danos), relacionando com a quantidade de nucleóides analisados. Assim, a escala de Score vai de 0-400. Os gráficos a seguir ilustram os resultados de danos do Cometa para os bioensaios 2 e 3.

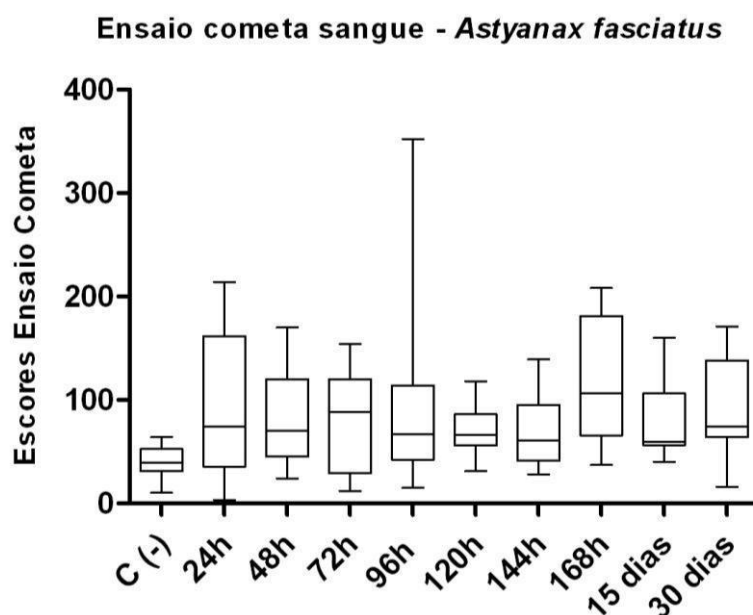


Figura 29: resultados da avaliação da genotoxicidade do cobre utilizando o bioindicador *Astyanax fasciatus* em eritrócitos.

A figura 29 ilustra os resultados obtidos no Ensaio Cometa para o bioensaio 2. Os resultados obtidos no Ensaio Cometa para o bioensaio 3 estão expostos na figura 30.

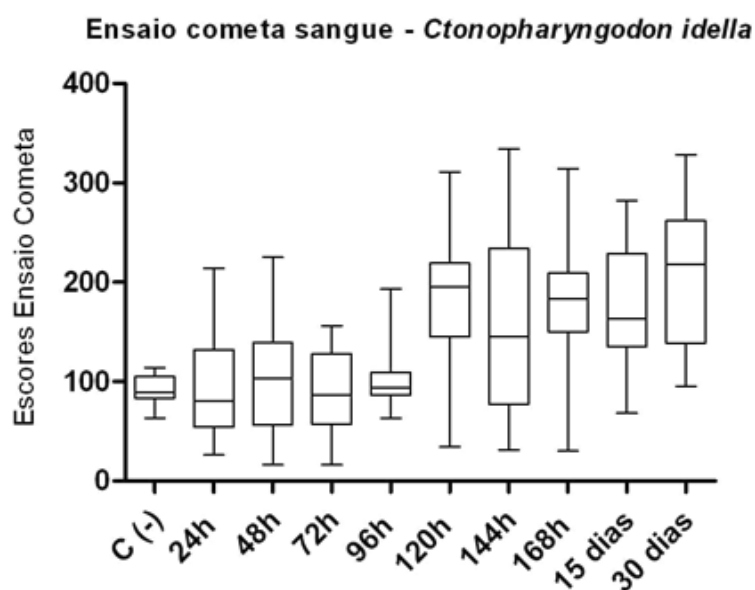


Figura 30: resultados da avaliação da genotoxicidade do cobre utilizando o bioindicador *Ctonopharyngodon idella* em eritrócitos.

Os resultados são expostos em gráficos do tipo *Boxplot* (gráfico de caixa), onde a linha central da caixa marca a mediana do conjunto de dados, a parte inferior da caixa é delimitada pelo quartil inferior e a parte superior pelo quartil superior; quanto maior a mediana maior são os valores desse grupo. Para as figuras 27 e 28, os grupos C (-) representam os resultados de análises de danos para os peixes do controle negativo, ou seja, para os animais que estavam acondicionados em um aquário com as mesmas condições dos aquários do bioensaio, porém sem a adição de cobre. Para o restante dos resultados, até o sétimo dia do bioensaio peixes foram sacrificados diariamente e as análises dos danos causados estão ilustradas separadamente nas figuras acima. Após o período de contaminação o sacrifício ocorreu no 15º e 30º dia.

Com base nos resultados obtidos para o ensaio Cometa com eritrócitos, sangue, pode-se observar diferença estatística entre o grupo controle negativo e todos os grupos expostos ao cobre. Observa-se ainda um aumento da genotoxicidade ao longo dos dias de exposição, com consequente aumento de lesões no DNA dos peixes, com pico máximo de dano em 168 horas para o ensaio com lambaris e em 144 horas para o ensaio com carpas. De um modo geral, os scores foram maiores no bioensaio 3, o que está condizente com as concentrações lábeis maiores encontradas neste ensaio, se comparado com o bioensaio 2; mais metal estava biodisponível para ser bioacumulado pelos peixes.

De acordo com estes resultados, o aumento dos danos caracteriza bioacumulação de cobre nos peixes, uma vez que a concentração da fração lábil decaiu ao longo do bioensaio e mesmo assim observam-se maiores danos.

6- CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível obter informações a respeito do material a ser utilizado na modificação do dispositivo DGT bem como aplicar o mesmo na especiação de espécies metálicas em ensaios ecotoxicológicos.

Os cuidados tomados quanto à limpeza do material evitam a superestimação de valores, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Já o tratamento da montmorilonita retira impurezas e aumenta a eficiência da mesma como material sorvente, o que é de extrema importância para sua utilização no dispositivo modificado. Os estudos empregados para avaliar a eficiência do argilomineral como material sorvente evidenciaram que o material pode ser empregado no DGT de maneira satisfatória, pois possui altas porcentagens de sorção e dessorção para a maioria dos elementos em estudo, e é possível utilizar fatores de correção (fe) para os casos onde as porcentagens de sorção não foram elevadas, de acordo com as equações utilizadas nos cálculos de concentração lábil dos elementos.

A aplicação do DGT modificado em aquários contaminados para a especiação de metais forneceu-nos concentrações de metal lábil, ou seja, a fração verdadeiramente responsável pelos possíveis efeitos tóxicos causados nos peixes, e ainda sua resposta frente ao material particulado em suspensão; a concentração da fração lábil decaiu com o aumento do teor de SST, devido a um processo conhecido por partição onde as espécies metálicas são retiradas da coluna d'água e deixam de estar biodisponível para os peixes, por processos de complexação e/ou adsorção na matéria orgânica dissolvida e nos sólidos em suspensão.

Além disso, verificamos que o sistema de exposição mais utilizado em ensaios ecotoxicológicos, de acordo com a literatura, pode influenciar na concentração total de espécies metálicas nos aquários, uma vez que esta não é mantida constante; assim sugere-se o uso do sistema de

exposição do tipo de fluxo-contínuo onde essa concentração total é mantida constante.

Assim, ficou evidente a importância da especiação química bem como a aplicação de dispositivos DGT em ensaios ecotoxicológicos, mostrando-se mais eficiente do que os ensaios ecotoxicológicos convencionais, uma vez que já determina a concentração verdadeiramente relacionada com o efeito causado, e ainda não necessita do conhecimento de uma ampla gama de parâmetros físico-químicos do meio ao contrário dos modelos atualmente aplicados nestes bioensaios como, por exemplo, o Modelo do Ligante Biótico (BLM).

Em relação aos resultados preliminares dos efeitos causados pelo cobre nos bioensaios com Lambari e Carpa, foi observado a bioacumulação do metal nos peixes uma vez que a fração lábil decaiu ao longo do experimento e mesmo assim os danos causados por esta fração nos peixes foi crescente com o passar do tempo.

Além disso, ficaram evidentes as vantagens do uso de dispositivos DGT, tais como a realização de medidas *in situ*, facilidade de uso, rapidez analítica, capacidade multielementar, habilidade de pré-concentração, etc.; além do menor custo do dispositivo modificado, devido ao menor custo da fase sorvente, em relação ao dispositivo comercial. A eficácia deste dispositivo modificado (DGT-MT) foi comprovada e comparada positivamente em relação ao DGT comercial anteriormente no nosso grupo de pesquisa (GQA), no trabalho de doutoramento de Vanessa Egéa dos Anjos (Anjos, 2010).

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE,G.; MASINI,J.C. Influence of pH, ionic strength and humic acid on adsorption of Cd (II) and Pb (II) onto vermiculite. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical Engineering Aspects*, 262,33,2005.

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas, 2006b, NBR 15350, Ecotoxicologia Aquática: toxicidade crônica de curta duração: método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata Echinoidea). Rio de Janeiro, 17p.

- AGUIAR, M.R.M.P.; NOVAES, A.C. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Química Nova*, 25, 1145, 2002.
- ALEXA, N.; ZHANG,H.; LEAD, J.R. development of a miniaturized diffusive gradients in thin films (DGT) device. *Analytica Chimica Acta*,, 655. 80, 2009.
- ALMEIDA,D.F. Aplicação do Modelo do Ligante Biótico – BLM – para a predição da biodisponibilidade de zinco nas águas do Rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, UFMG, 2007.
- ANDRADE, C. F. F. *Avaliação in situ da especiação de metais traço no estuário da Lagoa dos Patos utilizando o sistema DGT*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Rio Grande, 2005.
- ANJOS, V.E.; ABATE,G.; GRASSI,M.T. Comparação da labilidade de metais empregando voltametria, difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e modelo computacional. *Química Nova*, vol, 33, nº 6, 1307-1312, 2010.
- ANJOS,V.E., Desenvolvimento e avaliação de sensores baseados em difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) para o estudo da especiação de metais em águas naturais. Tese de doutorado, UFPR, 2010.
- ANJOS, V.E.; ABATE,G.; GRASSI,M.T. Potentialy of the use of montmorillonite in diffusive gradient in thin film (DGT) devices for determination of labile species of Cu, Cr,Cd, Mn, Ni, Pb and Zn in natural waters. *Br J Anal Chem*, 04, 187–193, 2011.
- AOUADA, F. A. *Síntese e caracterização óptica, morfológica e mecânica de hidrogéis de poliacrilamida com material eletro-óptico confinado: polímero condutor e cristais líquidos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; ABRÃO, J.J.; GUARDIA, M . Especiação de Arsênio – uma revisão. *Química Nova*, 23(1), 2000.

- BATLEY, G. E.; APTE, S. C.; STAUBER, J. L. Speciation and Bioavailability of Trace Metals in Water: Progress Since, 1982. *Australian Journal of Chemistry*, 57, 903, 2004.
- BENDO, A. *Especiação química de cobre nas águas da região costeira da Ilha de Santa Catarina utilizando voltametria de redissolução catódica e métodos espectrométricos de emissão e absorção atômica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- BENOIT, G.; OKTAY-MARSHALL, S. D.; CANTU II, A.; HOOD, E. M.; Coleman, C. H.; Corapcioglu, Santschi, P. H. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al and Mn between filter-retained colloids, and solution in six Texas estuaries. *Marine Chemistry*, 45, 307, 1994.
- BHATTACHARYYA, K. G.; GUPTA, S. S. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140, 114, 2008.
- BOMBAIL, V., AW, D., GORDON, E., BATTY, J. (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, v. 44, p.383-392.
- BOTELHO, A. M. S. *Especiação de íons metálicos*. Tese de Doutorado, Universidade do Porto, 1998.
- BUFFLE, J.; HORVAI, G. *In situ monitoring of aquatic systems: Chemical analysis and speciation*, in IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, John Wiley e Sons Ltd., New York, v6, 2000.
- BURGOS, R. P. Conceptual methodology for assessing the bioavailability and toxicity of heavy metals in the aquatic environmental. Disponível em: <http://ivem.eldoc.ub.rug.nl>, 2005.

- CAMPBELL, P. G. C.. *Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model*. In Tessier A., Turner, D. R., (eds). Metal speciation and bioavailability in aquatic system. Wiley. pp. 45-102, 1995.
- CASTRO, F.C.D. Contribuição do Modelo do Ligante Biótico (BLM) para o estabelecimento de critérios de qualidade de água superficial para cobre na região de Carajás,PA. Dissertação de mestrado, UFMG, 2009.
- CAVANCANTI,J.V.F.L., ABREU,C.A.M.; MOTTA, M.A.; BARAÚNA, O.S.; PORTELA, L.A.P. Preparação e utilização de uma argila esmectítica organofílica como adsorvente de fenol. *Química Nova*, 32, 8, 2051, 2009.
- COELHO,A.C.V.; SANTOS,P.S.; SANTOS,H.S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. *Química Nova*, 30, 1, 146, 2007.
- COSTA, J.R. Distribuição de metais em peixes marinhos ao longo do litoral sudeste do Brasil, Monografia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2007.
- DAL PONT, G. Aplicabilidade do Modelo do Ligante Biótico (BLM) na avaliação da contaminação por cobre em águas brancas da Amazônia. Trabalho de conclusão de curso, UFPR, 2009.
- DAVISON,W.; FONES,G.; HARPER,M.; TEASDALE,P.; ZHANG,H. Dialysis,DET and DGT: in situ diddusional techniques for studying water, sediments and soils. Em: *In situ chemical monitoring aquatic systems: chemical analysis and speciation*; Buffle,J., Horvai, G., Eds.; Wiley: Chichester,2000.
- DE BARROS,S.R.C.; Estudo da partição de metais traço em uma linha d'água de um tanque de cultivo de camarão marinho do município de Santa Rita – PB. Dissertação de mestrado, UFPB, 2006

- DE CAMPOS, M. S. Especificação de elementos-traço e formas de enxofre em sedimentos de rios da Região Metropolitana de Curitiba. Relatório Anual de Atividades, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2010.
- DI TORO, D.M; ALLEN,H.E.; BERGMAN,H.L.; MEYER,J.S.; PAQUIN,P; SANTORE,R.C. The Biotic Ligand Model – a computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. Environmental Program in a series on Copper in the Environment and Health,2000.
- Drever, J. I. The geochemistry of natural waters. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA, 437 p.,1988.
- GARBARINO, J. R.; HAYES, H. C.; ROTH, D. A.; ANTWEILER, R. C.; BRINTON, T. I.; TAYLOR, H. E. *Heavy Metals in the Mississippi River*, U.S. Geological Survey Circular, 1133, Reston, Virginia, 1995.
- GARMO, O.A.; DAVISON,W.; ZHANG,H. Interactions of trace metals with hydrogels and filter membranes used in DET and DGT techniques. *Environmental Science & Technology*, 42, 5682, 2008.
- GERVASIO, A.P.G.; LAVORANTE, A.F.; MORAES, M.C.B.; GINÉ, M.F.; MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. *Química Nova*, 26,1, 65, 2003.
- GIMPEL, J.; ZHANG, H.; HUTCHINSON, W.; DAVISON, W. Effect of solution composition, flow and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusive gradient in thin films technique. *Analytica Chimica Acta*, 448, 93, 2001.
- GIMPEL,J.; ZHANG,H.; DAVISON,W.; EDWARDS,A.C. In situ trace metal speciation in lake surface waters using DGT, dialysis and filtration. *Environmental Science & Technology*, 37, 138,2003.

GONTIJO, A.M.M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p.173-200, 2003.

HAWKES, H.E.; WEBB, J.S. *Geochemistry in mineral exploration*, Academic Press, 2^a ed., p 657, 1996.

HUGGETT, R. J., KIMERIE, R. A., MEHRIE JR., P. M., BERGMAN, H. L. (1992) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Boca Raton: Lewis Publishers.

INAP, International Network for Acid Prevention. *Diffusive gradients in thin-films (DGT): A technique for determination bioavailable metal concentrations*, 2002.

JACKSON, T. A.; BISTRICKI, T. Selective scavenging of Cu, Zn, Pb, and As by Fe and Mn oxyhydroxide coatings in lakes polluted with mine and smelter wastes: results of energy dispersive X-ray micro-analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, 52, 97, 1995.

KERSANACH, M.W.; ANDRADE, C.F.F.; ZHANG, H.; MILANI, M.R.; NIENCHESKI, L.F.H. In situ Measurement of Trace Metals in Estuarine Waters of Patos Lagoon using Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). *J.Braz.Chem.Soc*, 20, 2, 333, 2009.

KÖSTER, W.; van LEEUWEN, H. P. *Physicochemical kinetics and transport at the biointerface: setting the stage*. Em *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces*; van Leeuwen, H. P.; Köster, W., Eds; vol. 9, IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems; Buffle, J., van Leeuwen, H. P., Series Eds.: Wiley: Chichester, 2004; pp 147.

KOVARIKOVA, V.; DOEEKALOVA, H.; DOCEKAL, B.; PODBORSKA, M. Use of the diffusive gradients in thin films technique (DGT) with various diffusive

- gels for characterization of sewage sludge-contaminated soils. *Anal. Bioanal. Chem*, 389, 2303, 2007.
- Langmuir, D. Aqueous Environmental Geochemistry. USA: Prentice-Hall, 1997.
- LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, v.544, p.43-64. 2003.
- MARTINEZ, C. E.; MCBRIDE, M. B., Solubility of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. *Environmental Science & Technology*, 32, 743, 1998.
- MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. Copper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). *Pan American Journal of Aquatic Sciences*, 3, 3, 2008.
- MATSUMIYA, H.; OHKOUCHI, R.; HIRAIDE, M. A water-in-oil emulsion containing Kelex-100 for the speciation analysis of trace heavy metals in water. *Analytica Chimica Acta*, 556, 438, 2006.
- MELO, V.F.; ANDRADE, M.; BATISTA, A.H.; FAVARETTO, N.; DE CAMPOS, M.S.; GRASSI, M.T. Chumbo e zinco em águas e sedimentos de área de mineração e metalurgia de metais. *Química Nova*, no prelo.
- MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Química Nova*, 27, 2, 251, 2004.
- PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; DÍAZ, F.R.V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. *Cerâmica*, 54, 213-226, 2008.
- PESAVENTO, M.; ALBERTI, G.; BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta*, 631, 129, 2009.

- PRETSCH, E.; THÜRER, R.; VIGASSY, T.; HIRAYAMA, M.; WANG, J.; BAKKER, E. Potentiometric immunoassay with quantum dot labels. *Analytical Chemistry*, 79, 5107, 2007.
- PULS, R. W.; LIN, Z. Potential indicators for the assessment of arsenic natural attenuation in the subsurface. *Advances in Environmental Research*, 7, 825, 2003
- REZENDE, E.I.P.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; ABATE, G. Estudo de sorção de herbicidas pelos argilominerais Vermiculita e Montmorilonita. [*Química Nova*](#), vol. 34, nº 1 21-27, 2011.
- RILEY, J.P.; TAYLOR, D. Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 40, 479, 1968.
- SANGI, M.R.; HALSTEAD, M.J.; HUNTER, K.A. Use of the diffusion gradient thin film method to measure trace metals in fresh waters at low ionic strength. *Analytica Chimica Acta*, 456, 241, 2002.
- SCALLY, S.; DAVISON, W.; ZHANG, H. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta*, 558, 222, 2006.
- SCHEFFER, E. W. O. Dinâmica e comportamento do cobre em ambientes aquáticos urbanos: influência de fatores geoquímicos e de sulfetos solúveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- SCHEFFER, E.W.; SODRÉ, F.F.; GRASSI, M.T. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. *Química Nova*, 30, 2, 332, 2007.
- SHARMA, V, K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 35, 743, 2009.

SIGG, L.; BLACK,F.; BUFFLE,J.; CAO,J.; CLEVEN,B.; DAVISON,W.; GALCERAN,J.; GUNKEL,P.; KALIS,E.; KISTLER,D.; MARTIN,M.; NOEL,S.; NUR,Y.; ODZAK,N.; PUY,J.; van RIEMSDIJK, W.; TEMMINGHOFF,E.; WAEBER,M.L.T.; TOEPPERWIEN,S.; TOWN, R.M.; UNSWORTH,E.; WARNKEN,K.W.; WENG,L.; XUE,H.; ZHANG,H. Comparasion of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. *Enviromental science & Technology*, 37, 1261, 2006.

SODRÉ, F.F.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; GRASSI, M.T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. *Química Nova*, 27,5,695, 2004.

SODRÉ, F. F. Especiação do cobre em águas naturais: influência de fatores associados à urbanização. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. *Aquatic chemistry*. 3ª Edição John Wiley & Sons, Nova York, 1996.

TEIXEIRA-NETO,E.;TEIXEIRA-NETO,A.A. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. *Química Nova*, 32,3,809,2009.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; van LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *IUPAC, Pure and Applied Chemistry*, 72, 1453, 2000.

TICE, R.R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Eds.), *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers, Oxford, p.315-339, 1995.

- TIPPING, E.; LOFTS, S.; LAWLOR, A.J. Modelling the chemical speciation of trace metals in the surface waters of the Humber system. *Science of The Total Environment*, 210-211, 63, 1998.
- TONI, L.R.M; DE SANTANA, H.; ZAIA, D.A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova*, vol 29, n4, 2006.
- TONIETTO, A.E.; GRASSI, M.T. Análise de especiação de cobre e zinco empregando voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial. *Química Nova, no prelo*.
- TORRE, M.C.A.; BEAULIEU, P.Y.; TESSIER, A. In situ measurement of trace metals in lakewater using the dialysis and DGT techniques. *Analytica Chimica Acta*, 418, 53, 2000.
- TREVISAN, L. C.; NÓBREGA, J. A. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18, 678, 2007.
- Twiss, M. R; Errecalde, O.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C; Jumarie, C.; Denizeau, F.; Berkelaar, E.; Hale, B.; van Rees, K. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Spec. Bioavail.* 13:9 -24, 2001.
- TWISS, M.R.; MOFFETT, J.W. Comparison of copper speciation in coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin-film techniques. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1061, 2002.
- van LEEUWEN, H. P; TOWN, R. M.; BUFFLE, J.; CLEVEN, R. F. M. J.; DAVISON, W; PUY, J.; van RIEMSDIJK, W. H.; SIGG, L. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 39, 8545, 2005.
- WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M., PEAKALL, D. B. (1997) *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis Eds, p. 321.

Warren, L. A.; Haack, E. A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth-Sci. Reviews*; 54:261-320, 2001.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. RiMa Editora, São Carlos, 2006

ZHANG, H.; DAVISON, W. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurements of trace metals in aqueous solution. *Analytical Chemistry*, 67, 3391, 1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Diffusional characteristics of hydrogel used in DGT and DET techniques. *Analytica Chimica Acta*, 398, 329, 1999.

ZHANG, G.; DAVISON, W. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry*, 72, 4447, 2000.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; FONES, G.; HARPER, M.; TEASDALE, P. *Dialysis, DET and DGT: In situ diffusional techniques for studying water, sediments and soils*. In: BUFFLE, J; HORVAI, G. In situ monitoring of aquatic systems: Chemical analysis and speciation, in IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, John Wiley e Sons Ltd., New York, v6, 2000.

ZHANG, H.; DAVISON, W. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry*, 73, 9, 2001.

ZHANG, S. Q.; HOW, W. G. Adsorption behavior of Pb(II) on montmorillonite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 320, 92, 2008.